

JUVENILE HORMONE OR ONE OF ITS AGONISTS AS A CHEMICAL LIGAND TO CONTROL GENE EXPRESSION IN PLANTS BY RECEPTOR MEDIATED TRANSACTIVATION

Publication number: JP2000500323 (T)

Publication date: 2000-01-18

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: A01H5/00; C07K14/705; C07K14/72; C12N5/10; C12N15/09;
C12N15/82; C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/566; A01H5/00;
C07K14/435; C12N5/10; C12N15/09; C12N15/82; C12Q1/68;
G01N33/53; G01N33/566; (IPC1-7): A01H5/00; C12N5/10;
C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/566

- European: C07K14/705G; C07K14/72A; C12N15/82B24B; C12N15/82C8D

Application number: JP19960514672T 19960927

Priority number(s): WO1996EP04224 19960927; US19950006108P 19951010

Also published as:

WO9713864 (A1)
TR9800657 (T1)
PL326223 (A1)
MX9802807 (A)
HU9900029 (A2)

more >>

Abstract not available for JP 2000500323 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9713864 (A1)

The present invention is drawn to a method of controlling gene expression in plants. Specifically, the method comprises transforming a plant with a USP receptor expression cassette which encodes a USP receptor and at least one target expression cassette which encodes a target polypeptide. Contacting said transformed plant with juvenile hormone or one of its agonists activates expression of the target polypeptide in the presence of said USP receptor polypeptide. Optionally, additional "secondary" receptor expression cassettes may be used, wherein the secondary receptor expression cassette encodes a receptor polypeptide distinct from USP. The method is useful for controlling various traits of agronomic importance, such as plant fertility. Also disclosed is a method of identifying previously unknown ligands for USP. Substances to be tested are identified by placing them in contact with plant cells transformed with a USP receptor expression cassette and a target expression cassette. The target expression cassette encodes a reporter polypeptide whose expression can be determined quantitatively or qualitatively, whereby the test substance is identified as a ligand for USP.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-500323

(P2000-500323A)

(43) 公表日 平成12年1月18日 (2000.1.18)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	チマート* (参考)
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A
C 1 2 N 5/10		C 1 2 Q 1/68	A
	15/09	G 0 1 N 33/53	F
C 1 2 Q 1/68			33/566
G 0 1 N 33/53	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁) 最終頁に続く

- (21) 出願番号 特願平9-514672
 (86) (22) 出願日 平成8年9月27日 (1996.9.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成10年4月8日 (1998.4.8)
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 6 / 0 4 2 2 4
 (87) 国際公開番号 W O 9 7 / 1 3 8 6 4
 (87) 国際公開日 平成9年4月17日 (1997.4.17)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 0 6 , 1 0 8
 (32) 優先日 平成7年10月10日 (1995.10.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

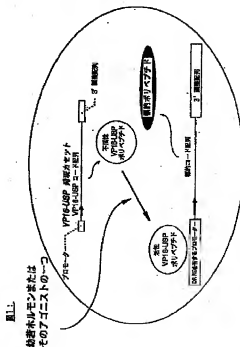
- (71) 出願人 ノバルティス・アクチエンゲゼルシャフト
 スイス、ツューバーン4058/パーゼル、シュ
 バルツバルトアレー215番
 (72) 発明者 クロスランド、ライル・ディーン
 アメリカ合衆国27514ノース・カロライナ
 州 チャペル・ヒル、ピンチョット・レイ
 ン108番
 (72) 発明者 ゴフ、スティブン・アーサー
 アメリカ合衆国27713ノース・カロライナ
 州 ダラム、ダンヒル・ドライブ227番
 (74) 代理人 弁理士 青山 葉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レセプター媒介トランス活性化による植物内のコントロール遺伝子発現のための化学リガンドとしての幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つ

(57) 【要約】

本発明は植物内の遺伝子発現のコントロール法を記載する。具体的に、本方法は U S P レセプターポリペプチドをコードする U S P レセプター発現カセットおよび標的ポリペプチドをコードする標的発現カセットで植物を形質転換することを含む。この形質転換植物の幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つへの接触により、U S P レセプターポリペプチドの存在下で標的ポリペプチドの発現が活性化される。所望により、第2の“レセプター発現カセット”を使用し、第2のレセプター発現カセットは U S P と異なるレセプターポリペプチドをコードする。この方法は植物繁殖能力のような種々の農学的に重要な性質のコントロールに有用である。以前は未知であった U S P のリガンドの同定法も記載されている。試験すべき物質を、U S P レセプター発現カセットおよび標的発現カセットで形質転換した植物細胞と接触させることにより同定する。標的発現カセットはレセプターポリペプチドをコードし、その発現が定量的または定量的に測定され、それにより試験物質が U S P のリガンドであると同定される。



【特許請求の範囲】

1. a) USPLレセプターポリペプチドをコードするUSPLレセプター発現カセット; および

b) 標的ポリペプチドをコードする標的発現カセット:

を含む、トランスジェニック植物細胞、植物材料または植物およびそれらの子孫。

2. 標的発現カセットの発現が植物繁殖能力を妨害する、請求項1記載の植物細胞、植物材料または植物。

3. 植物細胞または植物を

a) USPLレセプターポリペプチドをコードするUSPLレセプター発現カセット; および

b) 標的ポリペプチドをコードする標的発現カセット

で形質転換することを含む、請求項1記載の植物または植物の製造法。

4. 発現カセットで形質転換した植物細胞または植物の子孫を得ることを含む、請求項3記載の方法。

5. 植物がメイズである、請求項1記載の植物。

6. 植物がコムギである、請求項1記載の植物。

7. a) レセプターポリペプチド(複数もある)を植物内で発現させる; および

b) 幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つと植物を接触させる:

ことを含む、請求項1記載の植物またはUSP受容体ポリペプチドと異なる第2のレセプターポリペプチドをコードする第2のレセプター発現カセットを更に含むこのような植物の遺伝子発現をコントロールする方法。

8. 標的ポリペプチドの発現が幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で増加または活性化する、請求項7記載の方法。

9. 標的ポリペプチドの発現が幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で減少または阻害される、請求項7記載の方法。

10. USPLレセプターポリペプチドが異種トランス活性化ドメインを含む、請求項7記載の方法。

11. 異種トランス活性化ドメインが単純ヘルペスウイルスのVP16タンパク質

由来である、請求項10記載の方法。

12. 第1のレセプターポリペプチドが、ECR、DHR38およびRXRからなる群から選択される、請求項7記載の方法。

13. アゴニストがフェノキシカルブ、ジオフェノラン、キノブレン、メトブレン、ヒドロブレン、ジオフェノラン、メトブレン酸、トリフルムロン、ヘキサムフルムロン、テフルベンズロン、フルフェノキスロン、フルシクロキスロンおよびルフェヌロン、ジフルベンズロンおよびクロルフルズロンからなる群から選択される請求項7記載の方法。

14. 標的発現カセットが反応エレメントの1から11コピーの間の5'調整領域を含む、請求項7記載の方法。

15. a) レセプターポリペプチド(複数もある)を植物内で発現させる;および

b) 幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つと植物を接触させる:
ことを含む、請求項2記載の植物または、第2のレセプターポリペプチドをコードする第2のレセプター発現カセットを更に含むこのような植物の繁殖能力をコントロールする方法。

16. 標的ポリペプチドの発現が幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で増加または活性化する、請求項15記載の方法。

17. 標的ポリペプチドの発現が幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で減少または阻害される、請求項15記載の方法。

18. USPまたは第2のレセプター発現カセットが、レセプターポリペプチドのコード配列に作業可能に結合した約特異的プロモーターを含む、請求項15記載の方法。

19. USPまたは第2のレセプター発現カセットが、レセプターポリペプチドのコード配列に作業可能に結合した雌しべ特異的プロモーターを含む、請求項15記載の方法。

20. 標的ポリペプチドがリボヌクレアーゼバルナーゼである、請求項15記載の方法。

21. 標的発現カセットが、繁殖能力を無効にするアンチセンス配列をコードする、請求項15記載の方法。

22. 標的ポリペプチドが有効な繁殖能力を回復させる、請求項15記載の方法。

23. 標的ポリペプチドがリボヌクレアーゼ阻害剤パルスターである、請求項22記載の方法。

24. a) USプレセプターポリペプチドをコードするUSプレセプター発現カセットおよび標的ポリペプチドをコードする標的発現カセットによる植物細胞の形質転換；

b) 植物細胞内でのUSプレセプターポリペプチドの発現；

c) 植物細胞と試験物質の接触；

d) 標的ポリペプチドの発現の測定；および

e) 標的ポリペプチドの発現を有意に活性化または阻害する試験物質の同定；

の段階を含む、植物細胞内で標的発現カセットの発現を活性化または阻害するUSプレセプターポリペプチドのリガンドの同定法。

25. 更に、形質転換細胞をUSプレセプターポリペプチドとは異なる第2のレセプターポリペプチドをコードする第2のレセプター発現カセットで形質転換し、第2のレセプターポリペプチドを発現させることを含む、請求項24記載の方法。

26. 標的ポリペプチドの発現が定質的に測定される、請求項24記載の方法。

27. 標的ポリペプチドの発現が定量的に測定される、請求項24記載の方法。

28. a) 当分野で既知の慣用法に従った新規試験物質の製造；

b) USプレセプターポリペプチドをコードするUSプレセプター発現カセットおよび標的ポリペプチドをコードする標的発現カセットでの植物細胞の形質転換；

c) 形質転換植物細胞の子孫細胞の培養；

d) 子孫細胞内でのUSプレセプターポリペプチドの発現；

e) 子孫細胞と段階 a) の試験物質の接触；および

f) 標的ポリペプチドの発現の測定；

g) 段階 a) に従った異なる試験物質での段階 e) および f) の反復；

h) 標的ポリペプチドを有意に活性化または阻害する試験物質の選択；および

i) 段階 h) で選択した物質について a) の段階の反復；

を含む、U S P レセプターポリペプチドのリガンドの製造法。

29. 請求項 28 記載の方法により得られる U S P レセプターのリガンド。

30. a) U S P レセプターポリペプチドをコードする U S P レセプター発現カセット；および

b) 標的ポリペプチドをコードする標的発現カセット；

を含むトランスジェニック植物材料または植物の製造により使用する、農学的方法。

31. 請求項 1 記載の植物における標的ポリペプチドの発現をコントロールするための幼若ホルモンまたは幼若ホルモンアゴニストの使用。

【発明の詳細な説明】

レセプター媒介トランス活性化による植物内のコントロール遺伝子発現のための
化学リガンドとしての幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つ

本発明は、植物内の遺伝子発現の化学コントロールに関する。特に、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つを化学リガンドとして使用し、植物細胞、およびトランスジェニック植物内の標的ポリペプチドのレセプター媒体発現を調整すること、並びに適当な発現カセットを含む植物材料または植物およびその子孫に関する。

ある場合、植物、植物細胞または植物組織における発現形質を時間的にまたは発現の程度をコントロールすることが望ましい。理想の状態は、意志によるこのような発現の調整であり、農作物、鑑賞用低木等に容易に適用できる化学物質により引き金を引く。この理想の状態を達成するために使用する、遺伝子発現を調整するようなシステムの一つは、植物に本来存在するかまだ未知であるが、核レセプターのステロイドおよびチロイドホルモンスーパーファミリーである。核レセプターのステロイドおよびチロイドホルモンスーパーファミリーは、哺乳類および昆虫で発見され、100を超える既知のタンパク質から成る。哺乳類で発見されたスーパーファミリー内のレセプターのいくつかは、レチノイン酸レセプター(RAR)、ビタミンDレセプター(VDR)、チロイドホルモンレセプター(T₃R)およびレチノイックXレセプター(RXR)である。スーパーファミリーのこれらおよび他のレセプターは、標的遺伝子の5'調整領域に結合し、化学リガンドのレセプターへの結合により、標的遺伝子発現をトランス活性化する。

上記のように哺乳類で発見されたレセプターに加えて、類似の構造および活性を有するレセプターが、昆虫シウジョウバエで同定されている。Koelle et al., Cell 67:59(1991); ChristiansonおよびKafatos, Biochem. Biophys. Res. Comm. 193:1318(1993); Henrich et al., Nucleic Acids Res. 18:4143(1990)。エルクジソンレセプター(EcR)は昆虫ステロイドホルモン20-ヒドロキシエクソン

ンを結合し、Ultraspiracle遺伝子(USP)の生産物とヘテロダイマー化した時

、遺伝子発現をトランス活性化する。20-ヒドロキシエクジソン以外の、ホルモンアゴニストのような更なる化学リガンドは、またEcRに同様の条件下で結合し、標的遺伝子のトランス活性化をもたらす。

USPはまた、そのリガンドが同定されていないため、“オーファン”レセプターであると見なされるが(Seagraves, Cell 67:225-228(1991))、核レセプターのステロイドおよびチロイドスーパーファミリーの仲間であることが示されている。USPはRXR α (Oro et al., Nature, 347:298-301(1990))と配列において関連し、RXRはEcRとヘテロダイマーを形成することが可能である(Thomas et al., Nature 362:471-475(1993))。幼若ホルモンアゴニストであるメトブレンおよびその誘導体であるメトブレン酸は、RXR α を経由した作用により、昆虫および哺乳類細胞の両方の組み換えレセプター遺伝子を転写的に活性化することが示されている(Harmon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:6157-6160(1995))。幼若ホルモンは、しかしながらRXR α -媒体トランス活性化を誘導しない(Harmon et al.)。今日まで、核幼若ホルモンレセプターに関する決定的証拠はないが(Harmon et al.:HenrichおよびBrown, Insect Biochem. Molec. Biol. 25:881-897(1995))、オーファンレセプターUSPが候補であり得るとして示されている(Harmon et al.:Seagraves;Oro et al., Current Opinion in Genetics and Development 2:269-274(1992)もまた参照)。

幼若ホルモンおよびそのアゴニストは、これらの化学物質の農学的使用が既知であったため、以前には認識されていなかった植物内の遺伝子発現の化学物質のコントロールの性質を提供する。今日まで欠失していたのは、これらの化学物質をトランスジェニック植物の標的遺伝子のトランス活性化の誘導のために使用できるようにする手段である。幼若ホルモンおよびそのアゴニストは、本明細書でオーファンレセプターUSPのリガンドとして示されている。この発見は、植物で本来存在しない核レセプターを利用する、植物の遺伝子制御法の実施を可能にする。これは、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの適用の作用のみが、遺伝子的操作された標的遺伝子の発現を誘発することを意味する。本発明で証明

するように、USPレセプターポリペプチド、およびそれをコードする植物発現

可能遺伝子は、植物内での機能が、標的ポリペプチドの発現をコントロールするものであり、それは幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で、USPレセプターポリペプチドが標的発現カセットの5'調整領域を活性化するように、開発される。このような植物内での遺伝子発現をコントロールする方法は、植物繁殖能力のような農学的に重要な種々の性質のコントロールに有用である。

本発明は、植物内の遺伝子発現をコントロールする方法を記載する。具体的に、この方法は、植物を、USPレセプターポリペプチドをコードする、USPレセプター発現カセット、少なくとも一つの標的ポリペプチドをコードする標的発現カセット、および所望によりUSPレセプターポリペプチドと異なる第2のレセプターポリペプチドをコードする第2のレセプター発現カセットで形質転換することを含む。この形質転換植物の幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つとの接触により、USPレセプターポリペプチドの存在下で標的ポリペプチドの発現を活性化または阻害する。所望により、更なる“第2の”レセプター発現カセットが使用し得、第2のレセプター発現カセットはUSPと異なるレセプターポリペプチドをコードする。この方法は、植物繁殖能力のような農学的に重要な種々の性質のコントロールに有用である。

本発明は、更に、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つにより活性化されるUSPレセプター発現カセットおよび標的発現カセットを含むトランスジェニック植物に関する。植物細胞環境内で有効なUSPの以前は未知であったリガンドの同定の方法もまた本発明に含まれる。試験すべき物質は、それをUSPレセプター発現カセットおよび標的発現カセットで形質転換した植物細胞と接触させることにより同定する。標的発現カセットはレポーターポリペプチドをコードし、その発現が定量的または定質的に測定でき、それにより試験物質がUSPのリガンドとして同定される。

図1は、5'調整領域に存在する重複反応エレメントと共に、VP16-USPレセプター発現カセットおよび標的発現カセットを含む植物細胞の図式的提示である。幼

若ホルモンまたはそのアゴニストの一つ存在下で、VP16-USPレセプターは標的ポ

リペプチドの発現を活性化する。

図2は、USP-VP16およびGAL4-EcRレセプター発現カセットの両方を含む植物細胞の図式的提示である。幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つへの暴露により、GAL4-EcRおよびUSP-VP16レセプターポリペプチドの組み合わせによる標的ポリペプチドの発現の活性化が逆転する。

図3は、化学リガンドテブフェノジド(RH5992としても既知)が存在する以外、図2に対応する。幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在により、また活性化がこれらの環境で逆転する。

“幼若ホルモン”は、昆虫により製造される化学化合物のクラスを意味する。幼若ホルモンは、昆虫の幼若特性の保持および続く成熟の防止により、幼虫変態をコントロールする。幼若ホルモンの作用は、行動的、生科学的または分子効果として生物学的に証明されている。数個の天然に存在する幼若ホルモンが単離され、特徴付けされている。幼若ホルモンのアゴニストは、幼若ホルモンの生理学的活性の1個またはそれ以上を示す化合物のクラスを意味する。幼若ホルモンのアゴニストは、幼若ホルモンの構造的アナログであっても無くてもよい。上記幼若ホルモン様生理的效果を直接産生する化合物の代謝前駆体であり得る化合物もまたこの記載に含まれる。例えば、メトプレンはメトプレンの代謝前駆体であり、それは次に、メトプレンの投与により観察される幼若ホルモン様生理的效果を産生する。

本明細書で使用の“レセプターポリペプチド”は、適用された化学リガンドに反応して、標的ポリペプチドの発現を活性化または阻害できるポリペプチドを意味する。レセプターポリペプチドは、リガンド結合ドメイン、DNA結合ドメインおよびトランス活性化ドメインから成る。リガンド結合ドメインは、その構造が相補的の化学リガンドに非共有的に結合する、アミノ酸の配列を含む。従って、リガンド結合ドメインおよびその化学リガンドが相補的結合対を形成する。DNA結合ドメインは、反応エレメント(RE)として知られる特異的ヌクレオチド配列に非共有的に結合する、アミノ酸の配列を含む。1個またはそれ以上の反応エ

レメントが標的発現カセットの5'調整領域に位置する。各REは、ハーフサイ

トの対を含み、各ハーフサイトは5-6塩基対コアを有し、そこで一本鎖DNA結合ドメインが一つのハーフサイトを認識する。ハーフサイトは、重複、回帰性反復または逆位反復として相対的直線配向で配列し得る。ヌクレオチド配列、間隙およびハーフサイトの直線的配向は、DNA結合ドメイン(複数もある)が反応エレメントと相補的結合対を形成するように決定される。トランス活性化ドメインは、TATAボックスにおける開始前(preinitiation)および集合中に、転写因子の操作に影響するサブドメインとして作用するアミノ酸の1個またはそれ以上の配列を含む。トランス活性化ドメインの効果は、転写開始事象の反復を可能にし、遺伝子発現の大きなレベルを導く。

“レセプター発現カセット”は、レセプターポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作業可能に結合した5'調整領域および非翻訳3'停止領域(停止コードおよびポリアデニル化配列)を含む。5'調整領域は、植物内の発現の促進を可能にする。

“USP”は、ショウジョウバエで発見されたレセプターUltraspiracleを意味する。“XR2C”としてもまた既知であり、それは単離およびクローンされ、そのリガンド結合ドメインは、既知のリガンド結合ドメインとの配列相同性により同定されているが(Henrich et al., *Nucleic Acids Research* 18:4143-4148 (1990))、それに結合する化学リガンド(複数もある)は現在まで未知である。本明細書で使用する定義“USP”は、レセプターの天然形およびその変異またはキメラ形を意味する。これは、本明細書に記載の変異またはキメラ形および、天然USPのリガンド結合ドメインを最少に含むUSPのキメラ形およびその変異体も含むが、これらに限定されない。USPの1つ以上の形を、本発明において同時に使用し得る。

“第2のレセプター発現カセット”は、3'停止領域に作業可能に結合したUSPと異なったレセプターポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作業可能に結合した5'調整領域のヌクレオチド配列を含む。第2のレセプター発現カセットは、EcR、RXR、DHR38 (Kafatos et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:7966-7970 (1995))およびその変異およびキメラ形を含むが、これらに限

定されない。

“部分”は、示された源由来のレセプターポリペプチドの部分の意味する。例えば、“USP-部分”は、天然Ultraspiracleレセプター由来のレセプターポリペプチドの部分の意味する。本明細書で使用する部分は、1個またはそれ以上のドメインを含み得、最少では、それに関連して部分が名づけられているレセプターのリガンド結合ドメインを含む。

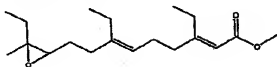
“キメラ”なる用語は、レセプターポリペプチドが、他の存在するドメインに関して異種のものである起源を有する少なくとも一つのドメインを含むことを意味する。“異種”は、レセプターポリペプチドに存在する1個またはそれ以上のドメインが、他の存在するドメインに関して本来の起源が異なることを意味する。例えば、単純ヘルペスVP16タンパク質由来のトランス活性化ドメインがショウジョウバエ由来のUSPレセプターに作業可能に結合している場合、VP16トランス活性化ドメインは、USP-部分に関して異種である。更に、USP由来のドメインがRXR由来のドメインと作業可能に結合し、機能性レセプターを製造する場合、キメラ融合体は、互いに異種であるドメインを有する。これらのキメラレセプターポリペプチドは、作業可能に結合したヌクレオチド配列によりコードされ、天然で発生しないコード配列をもたらす。本発明のキメラレセプターポリペプチドは、ポリペプチドのN-末端からC-末端部分の直線的命名法を参考にしている。この命名法を使用して、USPレセプターのN-末端領域に付加されたVP16由来のトランス活性化ドメインを有するキメラレセプターポリペプチドは、VP16-USPと名づけられる。逆に、VP16がUSPレセプターのC-末端に付加されている場合、キメラレセプターポリペプチドは、USP-VP16と呼ばれる。

遺伝子構築物は、5'調整領域およびその作業可能に結合したコード配列に関連して名づけられ、5'調整領域はスラッシュ(/)の前に、コード配列はスラッシュの後に記される。例えば、遺伝子構築物35S/USP-VP16は、VP16のトランス活性化ドメインがUSPのC-末端領域に付加されている、キメラレセプターUSP-VP16をコードするDNAに作業可能に結合したカリフラワー・モザイク・ウ

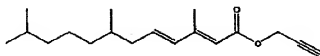
イルスの35Sプロモーターを意味する。レセプターポリペプチドを参考にした場合、プロモーターは示されない。例えば、上記遺伝子構築物はUSP-VP16ポリペプチドをコードする。

“標的発現カセット”は、化学リガンドの存在下で、その発現がレセプターポリペプチドにより活性化または阻害される、標的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作業可能に結合した5'調整領域のヌクレオチド配列を含む。標的遺伝子の5'調整領域は、コアプロモーター配列、転写配列の開始および反応エレメントまたはレセプターポリペプチドの相補的結合に必要な反応エレメントを含む。5'調整領域は植物における発現を促進できる。標的発現カセットは、また3'停止領域(停止コドンおよびポリアデニル化配列)も含む。

幼若ホルモンI、II、IIIおよびOが、Iの置換変異体として既知である。例えば、Fundamentals of Insect Physiology, M. S. Blum, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1985編参照。幼若ホルモンIは、式10, 11-エポキシ-7-エチル-3, 11-ジメチル-トランス-2, 6-トリデカジエン酸メチルを有する。幼若ホルモンIの構造を下に示す。

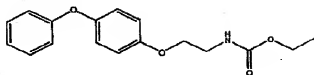


幼若ホルモンアゴニストは、幼若ホルモンの1個またはそれ以上の生理活性を示す化合物である。幼若ホルモンと構造関連性を有する、この特性を有する化合物は、キノブレン、メトブレン、ヒドロブレンおよびメトブレン酸を含むが、これらに限定されない。これらの幼若ホルモンアゴニストの一つの例としてのキノブレンの構造を下に示す。



幼若ホルモンと構造関連性を有しない幼若ホルモンアゴニストもまた既知である。このような化合物は、多環性、非イソプレノイド化合物フェノキシカルブで

あり、これは既知の幼若ホルモンアゴニストであるが、これに限定されない。フェノキシカルブの式は、[2-(4-フェノキシフェノキシ)エチル]カルバミン酸エチルである。フェノキシカルブの構造を下に示す。



本発明で有用な他の幼若ホルモンアゴニストは、化合物ジオフェノラン、ジフェニルエーテル化合物である。ジオフェノランの式は、4-(2-エチル-1,3-ジオキソラン-4-イルメトキシ)フェニルフェニルエーテルである。この化合物は既知の幼若ホルモン活性を有し、化合物フェノキシカルブまたはメトブレールと同様の方法で機能すると予期される。

本発明における幼若ホルモンの使用は、いくつかの利点を提供する。第1に、化合物は合成物であり、容易に入手可能である。第2に、多くのこれらの化合物が農学的製品として既に試験され、このような化合物が作物への野外適用に“直ぐに使用できる”という利点を有する。

本発明は、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つがUSPレセプターに対する化学リガンドとして作用するという発見の使用を成す。USPに対する化学リガンドは、以前は未知であったが、本発明より植物発現可能USPレセプター発現カセットおよび適当な標的発現カセットと共に使用され、植物における遺伝子発現のコントロールの新規方法を製造する。

多くの昆虫成長調整物が、昆虫の脱皮を阻害することが判明し、脱皮の開始に関与するレセプターに直接機能しているようである。このような昆虫成長調整物は、トリフルムロン((1-2-クロロベンゾイル)-3-(4-トリフルオロメトキシフェニル)ウレア)、ヘキサムフルムロン(1-[3,5-ジクロロ-4-(1,1,2,2-テトラフルオロエトキシ)フェニル]-3-(2,6-ジフルオロベンゾイル)ウレア)、テフルベンズロン(1-(3,5-ジクロロ-2,4-ジフルオロフェニル)-3-(2,6-ジフルオロベンゾイル)ウレア)、フルフェノキシウロン(

—[4-(2-クロロ- α , α , α -トリフルオロ-p-トリルオキシ)-2-フルオロフェニル]-3-(2,6-ジフルオロベンゾイル)ウレア)、フルシクロキシウロン(1-[α -(4-クロロ- α -シクロプロピルベンジリデンアミノ-オキシ)-p-トリル]-3-(2,6-ジフルオロベンゾイル)ウレア)およびルフェヌロン(1-[2,5-ジクロロ-4-(1,1,2,3,3-ヘキサフルオロプロポキシ)フェニル]-3-(2,6-ジフルオロベンゾイル)ウレア)を含むが、これらに限定されない。更なるベンゾイルフェニルウレア殺虫剤は、ジフルベンズロンおよびクロルフルズロンを含むが、これらに限定されず、本発明で使用し得る。

レチノイン酸またはその誘導体もまたトランスジェニック植物の遺伝子発現のコントロールに有用なリガンドであり得る。レチノイン酸は、最近、培養哺乳類細胞系においてUSP遺伝子生産物の異種発現を活性化することが示されている(Harmon et al.)。従って、昆虫レセプターは、下記のように、レセプターおよび標的遺伝子構築物の適当な組み合わせを担持するトランスジェニック植物へのレチノイン酸誘導体の適用により調整し得る。

天然源は、トランスジェニックメイズまたはコムギのようなトランスジェニック植物における昆虫レセプター発現のリガンドとしても作用し得る。多くの植物が昆虫脱皮を加速または阻害する化合物を合成することが判明している。例えば、最も活性なエクジステロイドの一つであるムリステロンが植物源から単離されている。植物の多くのファミリーがエクジステロイドまたは幼若ホルモン活性を製造することが知られている。

幼若ホルモンアンタゴニストは、リガンドとして働き、トランスジェニック植物における遺伝子発現を調整し得る。このようなりガンドの例は、4-[2-tert-ブチルカルボキシルオキシ]-安息香酸エチル；ピスチオカルバメート、5-メトキシ-6-[1-(4-メトキシフェニル)エチル]-1,3-ベンゾジオキソールまたはE-3-メチル-2-ドデセン酸エチルである。このようなアンタゴニストリガンドは、修飾昆虫レセプターを発現する異種植物システムにおけるトランス遺伝子の低基底発現を活性化するか、高基底遺伝子発現を阻害するために働く。

本発明の方法は、植物細胞または植物をUSPレセプター発現カセットおよび標的発現カセットで形質転換することを含む。得られる植物細胞、植物またはその子孫内での、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下の、USPレセプターポリペプチドの発現により、トランスジェニック細胞または植物内の標的発現カセットの5'調整領域が活性化される(図1)。本発明によりUSPのリガンド結合ドメインに結合すると認識された幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つは、本発明に必須である。

標的発現カセットの発現のコントロールは、植物内に、USPと異なる第2のレセプターポリペプチド(複数もある)を所望により発現させることによりまた達成できる(図2および3)。本発明に含まれる付加的な第2のレセプターポリペプチドの例は、EcR、RXR、DHR38(Kafatos et al., Proc. Natl. Acad. Sci, 92:7966-7970(1995))およびこれらの変異またはキメラ形を含むが、これらに限定されない。リガンド誘発トランス活性化を媒介するためのこれらのレセプターの使用は、1996年2月19日に出願された国際出願PCT/EP96/00686に記載され、本明細書に引用して包含させる。

USPレセプターポリペプチドのリガンド結合ドメインは、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つによる標的発現カセットの5'調整領域の活性化の化学コントロールの手段を提供する。USPはステロイドレセプターRXR α と類似であり、それは化学リガンドとして、9-cis-レチノイン酸を有する。USPはまたEcRレセプターポリペプチドとヘテロダイマーを形成し、幼若ホルモンおよびそのアゴニストとは無関係である、EcRに結合する昆虫ホルモンであるエクジソンの投与に反応して形質転換マウス腎臓における標的ポリペプチドの発現を調整することが示されている(WO94/01558)。レセプターUSPおよびそのリガンド結合ドメインは、本発明において、下記実施例に記載のように、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの適用に反応して、植物内の標的ポリペプチド発現のコントロールに特に有用であることが判明した。

USPレセプターポリペプチドのキメラ形は、また、本発明で使用され、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で標的ポリペプチドの発現を活性

化し得る。キメラUSPレセプターポリペプチドのDNA結合ドメインまたはトランス活性化ドメインは、そのトランス活性化またはDNA結合の効果を基本にして、異種源から選択し得る。キメラレセプターポリペプチドのこのドメインは、同様な転写調整機能を有する任意の生物、例えば植物、昆虫および哺乳類から得られ得る。本発明の一つの態様において、これらのドメインは核レセプターのステロイドおよびチロイドホルモンスーパーファミリーのメンバーから選択される。キメラUSPレセプターポリペプチドの使用は、異なる源からのドメインの組み合わせによる利点を有する。本明細書に記載のキメラレセプターポリペプチドは、リガンドとしての幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つと共に特異的反応エレメントの、最適トランス活性化活性または改変RE結合または認識の組み合わせの利点を有する。従って、キメラポリペプチドは具体的目的に適合するように構築し得る。これらのキメラレセプターポリペプチドはまた植物細胞中の異種環境において改善された機能性も提供する。

トランス活性化、リガンド結合およびDNA結合ドメインを機能的配列でキメラレセプターポリペプチドに集合し得ることも本発明の一部であると見なされる。例えば、トランス活性化ドメインの一つのサブドメインが天然に存在するN-末端部分に見られる時、本発明のキメラレセプターポリペプチドは、N-末端のサブドメインの代わりに、またはそれに加えて、C-末端にトランス活性化サブドメインを含み得る。本明細書に記載のキメラレセプターポリペプチドは、また同じタイプの多重ドメインを含み得、例えば、レセプターポリペプチド当たり1個以上のトランス活性化ドメイン(または二つのサブドメイン)を含み得る。

従って、本発明の一つの態様は、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で標的ポリペプチドの発現を活性化し、またトランス活性化に優れた特性を有する、USPレセプターポリペプチドを提供する。トランス活性化ドメインは、RNAポリメラーゼにより生産的転写開始を増加する、アミノ酸配列として定義できる。(generally Ptashne, Nature 335:683-689(1988)参照)。異なるトランス活性化ドメインは、転写開始の増加に関して異なる効果の程度を有することが知られてる。本発明において、植物細胞内において優れたトランス活性効果

を有するトランス活性化ドメインを使用することが望ましく、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在に反応して高レベルの標的ポリペプチド発現を産生する。本発明の方法で特に有効であることが示されているトランス活性化ドメインはVP16(単純ヘルペスウイルスから単離)を示すが、これに限定されない。本発明の一つの好ましい態様において、VP16由来のトランス活性化ドメインはUSP一部分に作業可能に結合し、植物内の標的ポリペプチド発現をコントロールするためのキメラUSPレセプターポリペプチドを製造する。他のトランス活性化ドメインもまた有効である。

DNA結合ドメインは、標的発現カセットの5'調整領域に存在する、反応エレメントと呼ばれるヌクレオチドの特異的配列へのUSPレセプターポリペプチドの結合を担うある機能的特性を有するアミノ酸配列である。核レセプターのステロイドおよびチロイドスーパーファミリーのDNA結合ドメインの構造は、種間で非常に保存的であり、従って、相補的結合対を形成するために使用される反応エレメントにおける変化を限定する。(Evans, Science 240:889-895(1988))。それにもかかわらず、かなりの柔軟性が、他の方法で反応エレメントを使用することにより遺伝子発現のコントロール法に挿入できる。本発明の好ましい態様において、適当な反応エレメントの多重コピーおよび好ましくは1から11の間のコピーを5'調整領域に置き、これは多重部位のUSPへのまたは任意の第2のレセプターポリペプチドへの結合を可能にし、活性化のより大きな程度をもたらす。

遺伝子コントロール法における更なる柔軟性が、5'調整領域における反応エレメントの直線配向または位置の変化により達成できる。クラスIIレセプタータンパク質により認識される反応エレメントは、二つの“ハーフサイト”で対称的に構成された“二分子”を有する。(Evans, Science 240:889-895(1988))。各レセプターポリペプチドは、“ハーフサイト”に結合する。これらの“ハーフサイト”は、重複、逆位反復または回帰性形式で配向し得る。本発明の一つの態様において、一つ以上のUSPレセプターポリペプチド分子が重複(DR)反応エレメントを認識し、それにより標的発現カセットの活性化が幼若ホルモンまたはその

アゴニストの一つの存在下で達成される。

本発明による遺伝子発現のコントロールの更なる柔軟性は、LexAまたはGAL4タンパク質を含むが、これらに限定されない、他の転写活性化因子DNA由来の結合ドメインおよび反応エレメントの使用により得られ得る。LexAタンパク質由来のDNA結合ドメインはE. coli由来のlexA遺伝子によりコードされ、その相補的結合部位(BrentおよびPtashne, Cell 43:792-736, (1985), これは、LexA/GAL4転写活性化因子を記載する)が使用できる。他の有用な源は、酵母のGAL4タンパク質由来である(Sadowski et al., Nature 335:563-564(1988), これはGAL4-VP16転写活性化因子を記載する)。本発明の好ましい態様の一つにおいて、任意の第2のレセプターポリペプチドのキメラバージョンが、GAL4 DNA結合ドメインを、EcR由来のリガンド結合ドメインを含む部分に融合させることにより構築される。

USPおよび任意の第2のレセプター発現カセットの5'調整領域は、更に植物組織および細胞内での発現を可能にするプロモーターを含む。適当なプロモーターは、レセプターポリペプチドの発現が構造的であり、増殖的に調整され、組織特異的、細胞特異的または細胞区画特異的であるように、レセプター発現カセットに関して選択する。プロモーターは、レセプターポリペプチド自体の発現が、植物内で化学的誘発され、それによりリガンドによるプロモーター誘導レベルが増加するように、選択し得る。特異的発現を付与するプロモーターエレメントと、化学的誘発発現を付与するものを組み合わせることにより、レセプターポリペプチドは、植物の特異的細胞または組織内で、化学物質適用に反応して発現または活性化され得る。

レセプターポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、植物内の発現の改善、機能の改善または両方のために修飾し得る。このような修飾は、コドン使用の改変、イントロンの挿入または変異の製造を含むが、これらに限定されない。本発明の一つの態様において、USPレセプターポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作業可能に結合した約特異的または雌しべ特異的プロモーターを含む発現カセットを使用し、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下

で標的ポリペプチドの発現を活性化する。

その発現が幼若ホルモンまたはそのアゴニストの存在下でレセプターポリペプチドにより活性化される、標的ポリペプチドをまた記載する。コード配列の発現は、本発明によりコントロールされ得るが、ただし、このコード配列に作業可能に結合したプロモーターを、U S P レセプターのDNA結合ドメインに相補的な反応エレメント(複数もある)および、所望により、第2のレセプターに必要な反応エレメント(複数もある)を含むように操作する。例えば、植物繁殖能力のコントロールに有効な標的ポリペプチドを、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下でU S P レセプターポリペプチドにより活性化する。

U S P レセプターポリペプチドの変異体はまた本発明に包含される。標的発現カセットの減少した背景活性化レベルの特性を有し、誘導が非誘発背景発現と比較して大きいように、変異体が製造できる。更に、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つへの結合を改変された変異体も開発できる。改変された結合特性を有する変異体は、そのアゴニストに独特な方法で、異なるアゴニストに反応する。例えば、変異U S P レセプターは、フェキシカルブのみに反応し、ヒドロブレンに反応しないように、従って、イソプレノイドおよび非イソプレノイド幼若ホルモンアゴニストの間を区別するように開発できる。化学変異誘発または部位直接変異誘発のような有用な変異誘発の方法が当分野で既知である。

他の方法において、変異レセプターポリペプチドは、U S P のリガンド結合ドメインをコードするヌクレオチド配列のP C R変異誘発により製造される。これらの変異レセプターポリペプチドは、酵母のような、それ自身簡便なスクリーニングおよび単離技術に適した宿主生物で発現される。このような宿主生物中で減少した基底活性および大きな倍率の誘導を示す変異レセプターポリペプチドのスクリーニングは、しかしながら、植物細胞における更なる試験のための候補を提供するに過ぎない。なぜなら、ステロイドおよびチロイドホルモンスーパーファミリー由来のレセプターが酵母中で機能できるが、トランスジェニック植物中では機能が予測したものではないことがグルココルチコイドレセプターでの仕事から明らかであるからである(Lloyd et al., Science 226:436(1994))。酵母から得

られる結果の適用の更なる限定は、GRを発現する酵母細胞が通常使用される化学リガンドであるデキサメタゾンに反応しないが、このリガンドは他の異種シテムで機能的であるという観察である(Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421-10425(1991))。

植物細胞における更なる試験が、変異レセプターポリペプチドをコードするレセプター発現カセットを製造し、それを標的発現カセットと組み合わせて植物細胞に形質転換することにより達成される。形質転換植物細胞は、標的発現カセットの5'調整領域の活性化について、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で、変異レセプターポリペプチドにより試験する。幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの非存在下で標的ポリペプチドの低基底発現を誘発し、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で標的ポリペプチドの高発現を誘発する変異レセプターポリペプチドが植物内の遺伝子発現のコントロールに有用である。

上記のように、本発明の方法は、遺伝子発現を、最低、基底レベルよりも統計的に有意に増加させるために使用できる。しかしながら、本発明はまたUSPおよびEcRのようなレセプターにより形成される複合体により媒介される遺伝子発現の活性化の統計的に有意な減少または阻害にも使用できる。このようなレセプター複合体により媒介される植物内の遺伝子発現のコントロールは、1995年3月3日に出願のPCT/EP96/00686の主題であり、本明細書に引用して包含させる。これらのレセプター複合体により媒介される活性化の逆転は、USPレセプターポリペプチドの化学リガンドである幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在によりもたらされる(図2および3参照)。幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下において、USP:EcR複合体が分解され、それにより活性化を逆転させる。例えば、USPおよびGAL4-EcR-C1レセプターポリペプチドを発現し、GAL4結合部位エレメントを有する標的発現カセットを含むトランスジェニック植物において、複合体によりもたらされる標的ポリペプチドの遺伝子発現の活性化は逆転される。この逆転は、テブフェノジド(RH5992としても既知)またはEcRのリガンド結合ドメインに結合する他の化学リガンドの

存在下、またはこのような化学リガンドの非存在下で起こる。

植物内での発現のために、レセプター発現カセットおよび標的発現カセットの両方に関して適当なプロモーターを選択しなければならない。特記しない限り、下記のプロモーターがレセプターポリペプチドまたは標的ポリペプチドの植物における発現を指示するために使用し得る。これらのプロモーターは、構造的、誘導可能、一時的調整、増殖的調整、化学的調整、組織優先的および組織特異のプロモーターを含むが、これらに限定されない。好ましい構造的プロモーターは、CaMV 35Sおよび19Sプロモーターを含むが、これらに限定されない(米国特許第5,352,605号)。更なる好ましいプロモーターは、数個のアクチン遺伝子の一つを含むが、これらに限定されず、これはほとんどの細胞タイプで発現されることが知られている。McElroy et al., *Mol. Gen. Genet.* 231:150-160(1991)により記載されるプロモーターは、本発明のレセプター発現カセットに容易に挿入され、単子葉植物宿主への使用に特に適している。更に別の好ましい構造的プロモーターは、ユビキチン由来であり、これは多くの細胞タイプで蓄積されることが知られているもう一つの遺伝子生産物である。ユビキチンプロモーターは、トランスジェニック植物で使用するために数個の種からクローンされている(例えば、ヒマワリ-Binet et al., *Plant Science* 79:87-94(1991); メイズ-Christensen et al., *Plant Molec. Biol.* 12:619-632(1989))。メイズユビキチンプロモーターはトランスジェニック単子葉システムで開発され、その配列および単子葉植物の形質転換のために構築されたベクターはEP-A-342926に記載されている。ユビキチンプロモーターはトランスジェニック植物、特に単子葉植物において、本発明で使用するのに適している。更に有用なプロモーターはメイズ由来のU2およびU5 snRNAプロモーター(Brown et al., *Nucleic Acids Res.* 17:8991(1989))およびアルコールデヒドロゲナーゼ由来のプロモーター(Dennis et al., *Nucleic Acids Res.* 12:3983(1984))である。

植物、特にメイズにおいて、本発明で有用な組織特異的または組織優先的プロモーターは、根、木髄、葉または花粉で直接発現するものである。このようなプロモーターはWO 93/07278に記載され、その全体を本明細書に引用して

包含させる。更に有用なのは、Scherthaner et al., EMBO J. 7:1249(1988)に記載のような種子特異的発現を付与するプロモーター；その全体を本明細書に引用して包含させるE P-A-578611に記載の約特異的プロモーターant32およびant43D；蒴(タペート)特異的プロモーターB6 (Huffman et al., J. Cell . Biochem. 17B:Abstract #D209(1993))；修飾S13プロモーター(Dzelkalns et al., Plant Cell 5:855(1993))のような離しベ特異的プロモーターである。

本発明でまた有用なのは化学誘発プロモーターである。このカテゴリーの植物内のレセプターポリペプチドまたは標的ポリペプチドの発現の指示に有用な具体的プロモーターは、例えば、その全体を引用して本明細書に包含させるE P-A-332104記載のものである。

レセプター発現カセットまたは標的発現カセットの5'調整領域は、また他の促進的配列も含み得る。多くの配列が、トランスジェニック植物において遺伝子発現を促進することが発見されている。例えば、ウイルス由来の多くの非翻訳リーダー配列が発現を促進することが知られている。特に、タバコ・モザイク・ウイルス(TMV、“Ω-配列”)、メイズ・クロロティック・モトル・ウイルス(MCMV)およびアルファルファ・モザイク・ウイルス(AMV)のリーダー配列が、発現の促進に有効であることが示されている(例えば、Gallie et al., Nucl . Acids Res. 15:8693-8711(1987);Skuzeski et al., Plant Molec. Biol. 15:65-79(1990))。文献により既知の他のリーダーは：

- ・ピコornaウイルスリーダー、例えば、EMCVリーダー(エンセファロミオカルディティス5'非コード領域)(Elroy-Stein, O. Fuerst, T. R., およびMoss, B. PNAS USA 86:6126-6130(1989))；
- ・ポチウイルスリーダー、例えば、TEVリーダー(タバコ・イッチ・ウイルス)(Allison et al., (1986);MDMVリーダー(メイズ・デュオルフ・モザイク・ウイルス)Virology, 154:9-20)；
- ・ヒト免疫グロブリン重鎖結合タンパク質(Bip)リーダー(Macejak, D.G.およびSarnow, P., Nature, 353:90-94(1991))；
- ・アルファルファ・モザイク・ウイルスのコートタンパク質由来の非翻訳リーダ

・アルファルファ・モザイク・ウイルスのコータンパク質由来の非翻訳リーダー (AMV RNA 4) (Jobling, S. A., および Gehrke, L., *Nature*, 325:622-625 (1987)) ;

・タバコ・モザイク・ウイルスリーダー (TMV) (Gallie, D. R. et al., *Molecular Biology of RNA*, 237-256頁 (1989)) ; および

・メイズ・クロロティック・モトル・ウイルスリーダー (MCMV) (Lommel, S. A. et al., *Virology*, 81:382-385 (1991))

を含むが、これらに限定されない。Della-Cioppa et al., *Plant Physiology*, 84:965-968 (1987) もまた参照。

種々のイントロン配列が、特に、単子葉植物細胞において、5'調整配列に添加した場合、発現を促進することが示されている。例えば、メイズ *Adh1* 遺伝子のイントロンは、メイズ細胞に挿入した時、その同種プロモーター下に、野生型遺伝子の発現を有意に促進することが判明している (Callis et al., *Genes Devel* 1:1183-1200 (1987))。

標的発現カセットの5'調整領域への1個またはそれ以上の上記エレメントの挿入に加えて、標的発現カセットに固有の他のエレメントも挿入し得る。このようなエレメントは最小プロモーターを含むが、これに限定されない。最小プロモーターにより、上流活性化因子の結合部位無しに、基底プロモーターエレメントが不活性になるか、ほとんど不活性となる。このようなプロモーターは、トランス活性化因子が存在しないか、促進剤または反応エレメント結合部位が欠失している時、植物内で低背景活性を有する。植物内の標的遺伝子に特に有用な一つの最小プロモーターは *Bz1* 最小プロモーターであり、これはメイズの *bronze1* 遺伝子から得られる。*Bz1* コアプロモーターは -53 から -58 に位置する *NheI* 部位で開裂して、“*myc*” 変異 *Bz1*-ルシフェラーゼ構築物 *pBz1LucR98* から得た (Roth et al., *Plant Cell* 3:317 (1991))。誘導化 *Bz1* コアプロモーターは、従って、-53 から +227 に伸び、トランスジェニックメイズに使用する時、5'非翻訳領域に *Bz1* イントロン-1 領域を含む。

プロモーターに加えて、種々の3'転写ターミネーターがまた本発明での使用

に利用可能である。転写ターミネーターは転写の停止および正しいmRNAポリアデニル化を担う。適当な転写ターミネーターおよび植物で機能することが知られているものは、CaMV 35Sターミネーター、tmlターミネーター、ノパリンシンターゼターミネーター、エンドウマメrbcS E9ターミネーターおよび当分野で既知の他のものである。これらは単子葉および双子葉の両方で使用できる。

ンドとしてどの程度まで有用か発見し得、または幼若ホルモンまたはその本発明の発現カセットは、多くの当分野で認識された方法で植物細胞内に挿入できる。当業者は、方法の選択が植物のタイプ、即ち単子葉植物または双子葉植物、形質転換の標的に依存することを認識する。適当な植物細胞の形質転換法は、マイクロインジェクション(Crossway et al., *BioTechniques* 4:320-334(1986))、エレクトロポレーション(Riggs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5605(1986))、アグロバクテリウム媒体形質転換(Hinchee et al., *Biotechnology* 6:915-921(1988))、直接遺伝子移入(Paszkowski et al., *EMBO J.* 3:2717-2722(1984))およびAgracetus, Inc., Madison, Wisconsin and BioRad, Hercules, Californiaから入手可能な装置を使用した弾道粒子加速(例えば、Sangort et al., 米国特許第4,945,020号;およびMcCabe et al., *Biotechnology* 6:923-926(1988)参照)を含むが、これらに限定されない。またWeissinger et al., *Annual Rev. Genet.* 22:421-477(1988);Sanford et al., *Particulate Science and Technology* 5:27-37(1987)(タマネギ);Christou et al., *Plant Physiol.* 87:671-674(1988)(ダイズ);McCabe et al., *Bio/Technology* 6:923-926(1988)(ダイズ);Datta et al., *Bio/Technology* 8:726-740(1990)(イネ);Klein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4305-4309(1988)(メイズ);Klein et al., *Bio/Technology* 6:559-563(1990)(メイズ);Klein et al., *Plant Physiol.* 91:440-444(1988)(メイズ);Fromm et al., *Bio/Technology* 8:833-839(1990)(イネ);Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2:603-618(1990)(メイズ);Svab et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530(1990)(タバコ葉緑体);Koziel et al., *Biotechnology* 11:194-200(1993)(メイズ);Shimamoto et al., *Nature* 338:274-277(1989)(イ

ネ);Christou et al., *Biotechnology* 9:957-962(1991)(イネ);EP-A-332581(カモガヤおよび他のプーイデアエ(Pooideae));Vasil et al., *Biotechnology* 11:1553-1558(1993)(コムギ);Weeks et al., *Plant Physiol.* 102:1077-1084(1993)(コムギ)も参照。

本発明の発現カセットのマイクロプロジェクトイルボンバードメントによる挿入の好ましい一連の態様の一つが、Koziel et al., *Bio/Technology* 11:194-200, 1993に記載され、その全体を本明細書に引用して包含させる。更に好ましい態様は、EP-A-292435に記載のメイズの原形質形質転換法であり、その全体を本明細書に引用して包含させる。マイクロプロジェクトイルボンバードメントによるコムギへの本発明の発現カセットの挿入のための特に好ましい一連の態様の一つは、WO94/13822に見られ、その全体を本明細書に引用して包含させる。

植物の形質転換は、一つのDNA分子または多重DNA分子(即ち、共形質転換)で行うことができ、これらの技術の両方が本発明の発現カセットでの使用に適している。多くの形質転換ベクターが植物形質転換について入手可能であり、本発明の発現カセットはこのようなベクターと共に使用できる。ベクターの選択は好ましい形質転換技術および形質転換の標的種に依存する。

多くのベクターが、*Agrobacterium tumefaciens*を使用して利用可能である。これらは、展開的に少なくとも一つのT-DNA境界配列を担持し、pBIN19のようなベクターを含む(Bevan, *Nucleic Acids Res.* (1984))。一つの好ましい態様において、本発明の発現カセットは、*Agrobacterium*での使用のためにバイナリーベクターpCIB200およびpCIV2001に挿入し得る。*Agrobacterium*媒介形質転換のためのこれらのベクターカセットは、以下の方法で構築された。pTJ575kanを、P TJS75のNarI消化により製造し(Schmidhauser & Helinski, *J. Bacteriol.* 164:446-455(1985))、テトラサイクリン耐性遺伝子の切断をし、続いてNPTIIを担持するpUC4K由来のAccIフラグメントを挿入した(Messing & Vieira, *Gene* 19:259-268(1982);Bevan et al., *Nature* 304:184-187(1983);McBride et al., *Plant Molecular Biology* 14:266-276(1990))。左および右T-DNA境界、植物選

択可能nos/nptIIキメラ遺伝子およびpUCポリリンカー(Rothstein et al., Gene 53:153-161(1987))を含むpCIB7のEcoRVフラグメントに、XhoIリンカーをライゲートし、XhoI-消化フラグメントをSalI-消化pTJS75kanにクローンし、pCIB200を製造した(E P-A-332104、実施例19もまた参照)。pCIB200は以下の独特なポリリンカー制限部位を含む: EcoRI、SstI、KpnI、BglII、XbaIおよびSalI。プラスミドpCIB2001はpCIB200の誘導体であり、更なる制限部位のポリリンカーへの挿入により製造された。pCIB2001のポリリンカーの独特な制限部位は、EcoRI、SstI、KpnI、BglII、XbaIおよびSalI、MluI、BclI、AvrII、ApaI、HpaIおよびStuIである。これらの独特な制限部位の包含に加えて、pCIB2001はまた植物および細菌カナマイシン選択、Agrobacterium媒体形質転換の左および右T-DNA境界、E. coliおよび他の宿主の間の移動のためのR K 2-由来trfA機能並びにまたR K 2由来であるOriTおよびOriV機能も含む。pCIB2001ポリリンカーはそれ自体の調整シグナルを含む植物発現カセットのクローニングに適している。

Agrobacterium媒体形質転換に有用な更なるベクターは、バイナリーベクターpCIB10であり、これは植物の選択のためのカナマイシン耐性をコードする遺伝子、T-DNA右および左境界配列を含み、広範囲の宿主範囲プラスミドpRK252由来の配列を含み、E. coliおよびAgrobacteriumの両方での増殖を可能にする。その構築はRothstein et al., Gene 53:153-161(1987)に記載されている。pCIB10の種々の誘導体が構築され、Gritz et al., Gene 25:179-188(1983)に記載のようにヒグロマイシンBホストトランスフェラーゼを挿入している。これらの誘導体はヒグロマイシンのみ(pCIB743)またはヒグロマイシンおよびカナマイシン(pCIB715、pCIB717)でのトランスジェニック植物の選択を可能にする。

直接遺伝子移入またはAgrobacterium媒体移入の形に使用される方法は、通常、抗生物質(例えば、カナマイシン、ヒグロマイシンまたはメトトレキサート)または除草剤(例えば、ホスホイノスリシン)に耐性を付与し得る選択可能マーカートと共に行うが、必須ではない。しかしながら、植物形質転換の選択可能マーカの選択は、本発明では重要ではない。

ある植物種について、異なる抗生物質または除草剤選択マーカーが好ましいことがある。形質転換に慣用的に使用される選択マーカーは、カナマイシンおよび関連抗生物質への耐性を付与するnptII遺伝子(Messing & Vierra, Gene 19:259-268(1982); Bevan et al., Nature 304:184-187(1983))、除草剤ホスホイノスリシンへの耐性を付与するbar遺伝子(White et al., Nucl Acids Res. 18:1062(1990), Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79:625-631(1990))、抗生物質ヒグロマイシンへの耐性を付与するhph遺伝子(Blochinger & Digglemann, Mol. Cell Biol. 4:2929-2931)およびメトトレキサートに耐性を付与するdhfr遺伝子(Bourouis et al., EMBO J. 2:1099-1104(1983))である。

除草剤Basta(またはホスホイノスリシン)による選択と組み合わせた直接遺伝子移入法に有用なこのようなベクターの一つは、pCIB3064である。このベクターはプラスミドpCIB246に基づいており、E. coli GUS遺伝子に作業的に融合したCaMV 35SプロモーターおよびCaMV 35S転写ターミネーターを含み、本明細書に引用して包含させるWO 93/07278に記載されている。ホスホイノスリシンに対する耐性を付与するために有用な遺伝子の一つはStreptomyces viridochromogenes(Thompson et al., EMBO J. 6:2519-2523(1987))由来のbar遺伝子である。このベクターは、それ自体の調整シグナルを含む植物発現カセットのクローニングに適している。

更なる形質転換ベクターはpS0G35であり、メトトレキサートに対する耐性を付与する選択可能マーカーとしてのE. coli遺伝子ジヒドロフォレートレダクターゼ(DHFR)を使用する。35Sプロモーター(~800bp)、メイズAdh1遺伝子由来のイントロン6(~550bp)およびpS0G10由来のGUS非翻訳リーダー配列18bpの増幅のためにPCRを使用した。E. coliジヒドロフォレートレダクターゼタイプII遺伝子をコードする250bpフラグメントをまたPCRで増幅し、これら二つのPCRフラグメントを、pUC19ベクター骨格およびノパリンシンターゼターミネーターを含むpBI221(Clontech)由来のSacI-PstIフラグメントと集合させた。これらのフラグメントの集合は、pS0G19を産生し、これはイントロン6配列、GUSリーダー、DHFR遺伝子およびノパリンシンターゼターミネー

ターと融合した35Sプロモーターを含んだ。pS0G19中のGUSリーダーのメイズ・クロロティック・モトル・ウイルス・チェック(MCMV)遺伝子由来のリーダー配列への置換は、ベクターpS0G35を産生した。pS0G19およびpS0G35はアンピシリン耐性のためのpUC-由来遺伝子を担持し、外来配列のクローニングに利用可能なHindIII、SphI、PstIおよびEcoRI部位を有する。

本発明の有利な態様の一つは、野外条件下での植物繁殖能力のコントロールへの使用である。有効な繁殖能力は生存可能な接合体の形成からもたらされ、生存可能な接合体を形成する種子の割合として計算できる。本発明により、繁殖能力は適当な標的をコードするヌクレオチド配列の標的発現カセットへの挿入によりコントロールでき、その標的ポリペプチドの発現は植物繁殖能力を妨害し、植物繁殖能力を統計的有意に減少または増加することを意味する。本発明の好ましい態様において、この標的ポリペプチドは繁殖過程を無効にし、生存可能な接合体の形成が妨害されるか止められることを意味する。このような無効繁殖能力は、生存可能な接合体を形成しない種子の割合として測定でき、種々の手段によりもたらし得る。これらは1) 生存可能配偶子の形成に重要な過程の中断または改変、2) もし形成されるなら、機能しない花粉または胚珠、または3) 胚嚢、雌しべ、柱頭または子孫を発育させるための導管の不全を含むが、これらに限定されない。本発明により、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つを、野外条件下でトランスジェニック植物に適用するか、接触させ、標的ポリペプチドが活性化し、繁殖能力を無効とする。本発明の他の態様において、この標的ポリペプチドの発現は、植物の繁殖能力を増加または回復させる。

異なる割合の有効または無効な繁殖能力が本発明により達成できることは認められる。好ましい態様において、80%以上および好ましくは95%以上の無効な繁殖能力が達成できる。繁殖能力の種々なレベルを提供する能力は、種々の農学的目的に適合する。

標的ポリペプチドのコード有用なコード配列は、繁殖能力を無効にできる生産物をコードするものを含むが、これに限定されない。これらのコード配列は、同種または異種起源であり得る。コード配列の遺伝子生産物は：

- ・ジフテリア毒素A鎖(DTA)、タンパク質合成を阻害する、Greenfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci.:USA, 80:6853(1983), Palmiter et al., Cell, 50:435(1987);
- ・Erwinia chrysanthemi EC16由来のペクチナーゼpelE、ペクチンを分解し、細胞融解をもたらす、Keen et al., J. Bacteriology, 168:595(1986);
- ・cms-Tメイズミトコンドリアゲノム由来のT-urf13(TURF-13); この遺伝子はURF13と名付けられたポリペプチドをコードし、ミトコンドリアまたは細胞質膜を分解する。Braun et al., Plant Cell, 2:153(1990); Dewey et al., Proc. Natl. Acad. Sci.:USA, 84:5374(1987); Dewey et al., Cell, 44:439(1986);
- ・ β -1,3グルカナーゼ、小胞子カロース壁の早熟分解をもたらす。Worral et al., Plant Cell 4:759-771(1992);
- ・ファージMu a 遺伝子由来のGinリコンビナーゼ、部位特異的DNAリコンビナーゼをコードし、植物の細胞内に発現された時、ゲノム再配列および細胞生存性の損失をもたらす。Maeser et al., Mol. Gen. Genet., 230:170-176(1991);
- ・Pseudomonas syringae由来のインドール酢酸-リジンシンテターゼ(iaaL)、リジンをインドール酢酸(IAA)に結合させる酵素をコードする。植物細胞内で発現された時、結合による細胞からのIAAの除去により、発育異常をもたらす。Roman et al., Genes and Development, 5:438-446(1991); Spena et al., Mol. Gen. Genet., 227:205-212(1991); Roberto et al., Proc. Natl. Acad. Sci.:USA, 87:5795-5801;
- ・Bacillus amyloliquefaciens由来のリボヌクレアーゼ(バルナーゼとしても既知)、それが発現された細胞内のmRNAを消化し、細胞死を導く。Mariani et al., Nature 347:737-741(1990); Mariani et al., Nature 357:384-387(1992); および
- ・Bacillus thuringiensis israeliensis由来のCytA毒素遺伝子、殺蚊剤および溶血性であるタンパク質をコードする。植物細胞内で発現された時、細胞膜の分解のために細胞の死をもたらす。McLean et al., J. Bacteriology, 169:1017-1

023(1987);Ellar et al., 米国特許第4,918,006号(1990)

を含むが、これらに限定されない。

・このようなポリペプチドはまたアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(A P R T)(MoffattおよびSomerville, *Plant Physiol.*, 86:1150-1154(1988); D N A s e、R N A s e : プロテアーゼ; サリチレートヒドロキシラーゼ等を含む。

標的発現カセットが、転写された時、A P R Tのような生存可能配偶子の形成に重要なコード配列のアンチセンスパージョンを製造するヌクレオチド配列に作業可能に結合した5'調整領域を含み得ることも更に認められる。あるいは、配偶子形成または機能に重要な遺伝子からのm R N Aを標的とするリボザイムを利用できる。このようなリボザイムは、約9ヌクレオチドのハイブリダイズ領域を含み、それは標的R N Aの少なくとも一部のヌクレオチド配列および標的R N Aの開裂に適した触媒領域と相補的である。リボザイムはE P - A - 3 2 1 2 0 1およびW O 8 8 / 0 4 3 0 0に記載され、本明細書に引用して包含させる。またHaseloffおよびGerlach, *Nature*, 334:585-591(1988);FedorおよびUhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci.:USA*, 87:1668-1672(1990);CechおよびBass, *Ann. Rev. Biochem.*, 55:599-629(1986);Cech, T. R., 236:1532-1539(1987);Cech, T. R. *Gene*, 73:259-271(1988);およびZangおよびCech, *Science*, 231:470-475(1986)も参照。

上記の標的ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、組織—または細胞—特異的方法でその発現を指示する5'調整領域に作業可能に結合できることもまた認められる。このような組織—または細胞—特異的発現を提供する手段は上記である。発現のこの特異性は、標的ポリペプチドの効果が生存可能な接合子の形成に必要な組織または細胞でのみ作用し、繁殖能力以外の植物へのその効果が有害でないことを確実にする。

トランスジェニック植物の雄性繁殖能力、トランスジェニック植物の雌性繁殖能力または両方をコントロールし得ることは、本発明の範囲内と認められる。雄性不稔性は機能的または生存可能な花粉の製造不全または不能である。雄性不稔性は、花粉の非形成をもたらす欠失または形成された場合、花粉の機能の欠失か

らもたらされ得る。従って、花粉が形成されないか、形成された場合、生存していないか、通常の条件下で有効な繁殖が不可能である。

雌性不稔性は、機能的または生存可能大孢子または胚嚢、または花粉発芽、生育または繁殖に必要な他の組織の形成の不全または不能である。雌性不稔性は、大孢子または胚嚢の非形成、または子房、胚珠、雌しべ、柱頭または子孫を発育させるための導管の不全をもたらす欠失に由来し得る。従って、生存可能胚嚢が発育しないか、または形成された場合、通常の条件下で有効な繁殖が不可能である。

例えば、適当なヌクレオチド配列に作業可能に結合した約特異的プロモーターを使用して、薬内にU S P レセプターポリペプチド(複数もある)を発現するトランスジェニック植物を得ることができる。加えて、トランスジェニック植物は、更に、リボヌクレアーゼバルナーゼのコード配列に作業可能に結合した、B z 1由来のコアプロモーターエレメントと共に適当な反応エレメント配列を含む5'調整配列を有する標的発現カセットを含む。幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの、U S P レセプターポリペプチド発現トランスジェニック植物への適用により、標的発現カセットの5'調整配列の活性化が、続く標的ポリペプチドバルナーゼの製造と共に起こる。薬内に特異的な得られるバルナーゼの発現は、細胞子および続く雄性不稔性をもたらす。レセプターポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作業可能に結合した雌しべ特異的プロモーターを使用した、レセプターポリペプチドおよび標的発現カセットの同様の組み合わせが、雌性不稔性を発生させ得る。

あるいは、植物を、標的ポリペプチドの発現が、雄性不稔性または雌性不稔性植物の繁殖能力を回復させるように操作できる。例えば、Ant43D、Ant32またはB 6プロモーターの制御下にバルナーゼ遺伝子を発現させて、またはMariani et al., Nature 347:737-741(1990)およびMariani et al., Nature 357:384-387(1992)に記載のように、TA29プロモーターの制御下に発現させて、植物が得られる。これらの植物は、更に、U S P レセプターポリペプチドおよび、同じ約特異的プロモーターまたは、メイヅユビキチン、3 5 S またはイネアクチンプロモーターの

ような構造的プロモーター由来の任意の第2のレセプターポリペプチドを含む。これらの植物は、更に、Bz1のコアプロモーターエレメントと共に、バルナーゼ阻害剤であるパルスターのコード配列に作業可能に結合した、適当な反応エレメント配列を有する5'調整配列を有する標的発現カセットを含む。植物は雄性不稔性であるが、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの適用により、標的発現カセットの5'調整配列の活性化が、続く標的ポリペプチドパルスターの製造と共に起こる。パルスターはバルナーゼポリペプチドのリボヌクレアーゼ活性を阻害し、約および花粉発育が正常に進行する。従って、繁殖能力が回復する。

同様の試みが、雌性不稔性のコントロールに使用できる。約特異的プロモーターの代わりに、雌性生殖組織での発現に特異的なプロモーターを使用することにより、バルナーゼ発現を導き、雌性不稔性植物を得ることができる。パルスターコード配列を含む標的系発現カセットの幼若ホルモンによる誘発は、雌性繁殖能力の回復をもたらす。

上記の試みは、回復剤遺伝子が創案できる雌性または雄性不稔性に利用できる。パルスター以外の可能性のある回復剤遺伝子はE P-A-412911に記載されている。

上記のトランスジェニック植物およびその種子に操作された遺伝子特性は、有性繁殖または無性増殖により経代され、従って子孫植物に維持され、伝達する。一般に、この維持および伝達は、耕作、種まきまたは収穫のような、特異的目的に合うように開発された既知の農業的使用を可能にする。水栽培または温室法のような特異的方法がまた適用できる。生育農作物が昆虫または感染体による攻撃および傷害ならびに雑草との競争に弱いため、雑草、植物疾病、昆虫、線虫および他の不利な状況をコントロールするための手段を行い、収率を改善する。これらは、土壌の耕作または雑草および感染植物の除去のような機械的手段ならびに、除草剤、殺菌剤、殺配偶子剤、殺線虫剤、成長調節剤、成熟剤および殺虫剤のような農学的化学物質の適用を含む。

本発明のトランスジェニック植物および種子の有利な遺伝的特性の使用は、更に植物育種においてもなし得、それは害虫、除草剤、または負荷に対する抵抗、

改善された栄養価、増加した収率または少ない寄宿または破損の損失による改善された構造のような改善された特性を有する植物の開発を目的とする。種々の育種段階が、交配すべき系の選択、親系の受粉の管理、または適当な子孫植物の選択などのような非常に定義された人的介入により特徴づけられる。所望の特性に依存して、異なる育種手段が取られる。関連技術は、当分野で既知であり、雑種形成、同系交配、戻し交配、多系交配、種々の混合、種間雑種形成、異数体法等を含むが、これらに限定されない。従って、本発明のトランスジェニック植物およびその種子は、改善された植物系の育種に使用でき、それは例えば、修飾遺伝的的特性により除草剤または殺虫剤処置のような慣用の方法の効果を増加し、またはこの方法を省略可能にする。あるいは、改善された負荷耐性の新規作物を得ることができ、その最適遺伝子“設備”により、かなり不利な発育条件に耐性でない生産物よりも高品質の生産物が収穫される。

種子製造において、種子の発芽の質および均質性は必須生産物特性であるが、農家により回収され、売られた種の発芽の質および均質性は重要ではない。作物を他の作物および雑草種子から離すこと、および種子運搬疾病のコントロールおよび良好な発芽率の種子の製造が難しいため、かなり広範囲な、良く定義された種子製造習慣が、純粋な種子の生育、条件付けおよび販売の分野の経験を有する種子製造者により開発されている。従って、農家にとって、彼ら自身の作物から収穫した種子を使用するよりも、特異的質標準に合う保証された種子を買うことが一般的習慣である。種子として使用する繁殖材料は、除草剤、殺虫剤、殺菌剤、殺真菌剤、殺線虫剤、殺軟体動物剤またはそれらの混合物を含む保護コーティングで通例処理されている。通例使用される保護コーティングは、カプタン、カルボキシシ、シラム(TMTD(登録商標))、メタラキシル(Apron(登録商標))およびピリミフォス-メチル(Actellic(登録商標))を含む。所望により、これらの化合物を、通例製剤分野で使用されている更なる担体、界面活性剤または適用促進アジュバントと共に製剤し、細菌、真菌または有害動物による傷害からの防御を提供する。防御コーティングは、液体製剤に繁殖材料を浸すか、複合湿潤または乾燥製剤でコーティングすることにより適用し得る。芽または果実の直接処置

のような、他の方法の適用がまた可能である。

本発明のトランスジェニック植物、トランスジェニック植物材料またはトランスジェニック種子を使用することを特徴とする、上記に例示の方法のような、新規農学的方法の提供が本発明のさらなる態様である。

本発明は、形質転換およびトランスジェニック植物への再生ができる植物で利用可能である。雄性不稔性、雌性不稔性または両方が適当な化学リガンドの適用によりコントロールできる。植物繁殖能力のコントロールはハイブリッド種子の製造に特に有用である。自己種子により汚染されていないハイブリッド種子を製造するために、受粉コントロール法は、交差受粉であり、自己受粉でないことを確実にするように実施しなければならない。これは、通常、機械的、遺伝的または化学的ハイブリダイジング剤(CHA)で達成する。例えば、メイズにおいて、現在の方法は雌性(または種子)親の機械的なふさの除去であり、時間がかかり、労働集約的方法である。コムギにおいて、機械的手段による繁殖能力のコントロールは、種子製造規模で实际的でなく、繁殖能力コントロールの遺伝的源は確立されていない。ハイブリッド種子の製造における本発明の使用は、有利な信頼性、雄性または雌性繁殖能力の容易な使用およびコントロールを提供する。

適当なレセプター発現カセットおよび標的発現カセットを含むトランスジェニック植物は、同型接合をなし、不明確に維持され得る。ハイブリッド種子を得るために、親1および親2の同型接合系を交配する。ハイブリッド種子を製造するための本発明を使用した一つの例は、親1を幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で雄性不稔性に操作し、一方親2を幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下で雌性不稔性に操作する。両方の親1および親2を幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つと接触させることにより、成功した種子産生のみが親1胚珠に受粉した親2花粉からもたらされる。本発明を使用した第2の例において、親1を幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの非存在下で雄性不稔性に操作し、親2を幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの非存在下で雌性不稔性に操作する。親1および親2を幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つと接触させて、自己受粉を経由した各系の維持をさせる。ハイブリッド種子を

製造するために、二つの親系を間作し、ハイブリッド種子のみを得る。繁殖能力は導入回復剤遺伝子により子孫ハイブリッド植物に貯蔵される。これらの手段により、所望のハイブリッド種子を製造し得る。

植物トランス遺伝子の化学的コントロールは、標的作物の全体的発育上の変化の調整、不良環境により適合するための作物の改変、特異的代謝経路の流動の改変、または単に単一の所望タンパク質生産物の高レベル発現の誘発に有用であり得る。植物における発育プログラムの化学的コントロールは、農家が、花発育、葉または果実器官脱離、または他の重要な発育段階開始のような特異的事象を決定できるようにし得る。特異的発育事象におけるこのような化学的コントロールは、農家が植え、収穫する時期に大きな柔軟性を可能にし、並びに早い冬または高温度の春のような特異的環境条件の予報に反応できるようにする。このような変化は、ショウジョウバエの異形化遺伝子と類似した、発育的または条件的反応経路に必要な遺伝子のコントロールにより成す。

代謝経路の遺伝子発現のコントロールも有用であり得る。固定された量のエネルギーのみが植物により消費され、貯蔵タンパク質の生合成のような特異的経路の促進は、澱粉または脂質の合成のようなエネルギー消費経路を経由した生合成流動の同時の損失をもたらすと考えられている。生合成経路が植物がある発育段階に到達した後のみ許容可能であるようなこのような条件において(即ち、成熟対生育)、遺伝子発現の化学的調整は有用であるか、恐らく到達する特異的生合成変化に必要なですらある。

遺伝子発現の化学的調整は、特異的タンパク質を高レベルで過発現させるのに有用であり得る。あるタンパク質は、異種宿主の細胞内、外來細胞下区画で発現した時、または過度に高レベルで発現した時でさえ、有毒であることが知られている。このようなタンパク質の化学的コントロールは、正常植物生育に有利であるか、または生合成タンパク質産業の植物の使用を正当化するために十分な植物量を得るためには必要ですらある。植物における大規模生合成が有用であり得るタンパク質は、産業的酵素、医薬タンパク質、抗原および他のタンパク質を含む。

。

ステロイドホルモンレセプターのリガンドを固定するための生物検定は既知で

ある(Evans et al., 米国特許第5,298,429号)。記載のレセプターはグルコルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン関連およびチロイドホルモンレセプターに限定されている。これらのレセプターはマウス腎臓細胞培養系(CV-1またはCOS細胞系)に形質転換され、適当な哺乳類ホルモン存在下でのキメラCAT遺伝子のトランス活性化発現の能力を試験された。これらのレセプターでの植物細胞の形質転換、または植物発現可能遺伝子の構築、またはリガンドとしての哺乳類ホルモンを有するこれ以外のレセプターも記載されていない。

USPは、OroおよびEvans、WO91/14695で“昆虫レチノイドレセプター”であると示唆された。予言的例において、USPをコードするXR2Cを昆虫細胞培養系(S2細胞系)に形質転換し、レチノイン酸の添加に反応してキメラCAT遺伝子をトランス活性化した。この記載は、このような“昆虫レチノイドレセプター”での昆虫または動物細胞の形質転換は、レセプターの活性化を導くことができる化合物のスクリーニングに使用できることを示唆する。しかしながら、Oro et al.は、後に、USPはショウジョウバエ細胞培養系検定においてレチノイン酸で活性化されず、RXRが反応性である条件下でUSPはメトプレノンを含む試験したレチノイドまたは幼若ホルモンに反応しないと報告している(Harmon et al.およびその中の引用文献)。

幼若ホルモンおよびそのアゴニストがUSPのリガンドであり、植物細胞内で、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの一つの存在下でUSPが標的遺伝子発現を活性化するために使用できるという本明細書の発現により、植物細胞環境で有効なUSPレセプターの新規リガンドの発見が可能となった。スクリーニングはトランスジェニック植物または植物細胞内でレセプター調整レポーター遺伝子をコードする標的発現カセットの発現を基本にしており、これはまたトランスジェニックUSPレセプターポリペプチドおよび所望によりUSPレセプターポリペプチドと異なる第2のレセプターポリペプチドも発現する。標的ポリペプチド発現のUSPレセプター媒体活性化の誘導をする能力を試験する化学物質を種々の濃度でトランスジェニック植物または植物細胞と接触させ、その後、レポーター遺伝

子の発現の検定を行い、標的ポリペプチドの発現を測定する。標的ポリペプチドの活性化または統計学的有意な増加を示す試験物質および標的ポリペプチド発現の阻害または統計的有意な減少を示す試験物質がU S Pレセプターポリペプチドのリガンドとして同定される。この方法は、植物環境内でU S Pのリガンドであるか以前は未知であった試験物質を、このように同定するか、または植物細胞環境内でU S Pのリガンドであることが疑われる試験物質をこのように確認することを可能にする。従って、本発明により以下の段階を行うことによりU S Pレセプターポリペプチドのリガンドの製造が可能となった：

- 化学分野で既知の慣用法に従った新規試験物質の製造；
- U S PレセプターポリペプチドをコードするU S Pレセプター発現カセットおよび標的ポリペプチドをコードする標的発現カセットでの植物細胞の形質転換；
- 形質転換植物細胞の子孫細胞の培養；
- 子孫細胞内でのU S Pレセプターポリペプチドの発現；
- 子孫細胞と上記のように合成した新規試験物質の接触；および
- 標的ポリペプチドの発現の測定；
- 更なる新規試験物質での上二つの工程の反復；
- 標的ポリペプチドを有意に活性化または阻害する試験物質の選択；および
- 選択物質の化学合成の反復。

上記の段階に従って得られるU S Pレセプターポリペプチドのリガンドは、本発明の更なる主題を構成する。

更に、この方法は、標的ポリペプチド発現のU S Pレセプター媒体活性化のアンタゴニストまたは阻害剤の同定に使用できる。このようなアンタゴニストは、標的ポリペプチド発現のリガンド誘発活性を減少させる能力により同定できる。

異なるレポーター遺伝子がスクリーニング法における標的発現カセットとして使用できる。一つの有用なレポーターはホタルルシフェラーゼである。標的発現カセットにおけるその使用は下記実施例7および9に記載する。他の有用なレポーター遺伝子はG U Sまたはグルクロニダーゼであり、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル β -D-グルクロニダーゼまたはo-ニトロフェニル β -D

ーグルクロニダーゼのような色素原性基質の開裂を触媒する。GUSレポーターは、例えば分光光度測定により定量的に、または可視検査により定質的に測定できる色素原性反応生産物を製造する利点を有する。スクリーニング法に有用なレセプター発現カセットはUSP、もしくはUSP-VP16またはVP16-USPのようなUSPのキメラバージョンである。

USPが哺乳類RXR α と配列において関連しており、RXRがEcRとのヘテロダイマーの形成が可能であるため(Thomas et al., Nature 362:471-475(1993))、RXRをコードするレセプター発現がまたスクリーニング法にも使用できる。この方法において、USPのリガンドが植物細胞内でRXRのリガの一つ以外の化学物質が植物細胞内の適当な化学リガンドとして同定し得る。

実施例

下記の実施例は、さらに、本発明を遂行する場合に使用する物質および方法並びにその結果を記載する。説明の目的で提供され、その詳説は請求の発明を制限するものではない。

実施例1：エクジソンレセプターをコードする、植物発現可能レセプター発現カセットの構築

ショウジョウバエのエクジソンレセプター(EcR)のDNAコード領域を、 λ gt11(Clontech、製造番号IL 1005b)に調製したカントンSさなぎ(6日)由来のcDNAライブラリーから、およびEcRのB1アイソフォームの公表されている配列(Koelle et al., Cell 67:59, 1991)から設計したオリゴヌクレオチドを用いたゲノムPCRで作製したフラグメントから、単離した。B1アイソフォームEcR配列は、標準的な方法を用いた自動シーケンス解析で確認し、公表されている配列と並べた(Talbot et al., Cell 73:1323, 1993)。発現された全長のEcRコード領域を、PCR反応でオリゴヌクレオチドSF43(5'-CGC GGA TCC TAA ACA ATG AAG CGG CGC TGG TCG AAC AAC GGC-3';配列番号1)を用いて修飾して、開始コドンからすぐ近くの上流にBamHIサイトを含むようにした。植物発現ベクターであ

るpMF6およびpMF7は、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータ

ー (CaMV 35S)、メイズ *Adh1* イントロン1、およびノバリンシンセターゼポリアデニル化および終止シグナルを含む (Goff et al., *Genes and development* 5:298, 1991参照)。ベクター pMF 6 および pMF 7 は、所望のコード配列の挿入に使用するポリリンカーの向きが異なるだけである。全長の EcR コード配列を、フランクキング *BamH I* 制限部位を用いて植物 CaMV 35S 発現ベクター pMF 6 にライゲーションした。このレセプター発現カセットを 35S / EcR と呼ぶ。

実施例2：ウルトラスピラクル (Ultraspiracle) レセプターをコードする、植物発現可能レセプター発現カセットの構築

ショウジョウバエの天然ウルトラスピラクルレセプター (USP) をコードする cDNA は、Henrich et al., *Nucleic Acids Research* 18:4143 (1990) に記載されている。フランクキング 5' および 3' 非翻訳領域をもつ全長の USP コード配列を、フランクキング *EcoR I* 制限部位を用いて植物発現ベクター pMF 7 (実施例1に記載) にライゲーションした。このレセプター発現カセットを 35S / USP と呼ぶ。

実施例3：GAL 4 由来の DNA 結合ドメインおよび EcR 由来のリガンド結合ドメインをもつレセプター発現カセットの構築

EcR の DNA 結合ドメインが、N 末端で融合した GAL 4 の DNA 結合ドメインで置換されている、レセプター発現カセットを構築した。ショウジョウバエの EcR の DNA コード領域は、実施例1に記載のようにして得た。GAL 4 の DNA 結合ドメインのコード配列を、プラスミド pMA 210 からサブクローニングした。Ma and Ptashne, *Cell*, 48:847 (1987)。

GAL 4 - EcR キメラレセプターポリペプチドをコードするレセプター発現カセットは、GAL 4 の DNA 結合ドメインを EcR のリガンド結合ドメインおよびカルボキシ末端に融合させることにより構築した。融合させるために、オリゴヌクレオチド SF23 (5'-CGC GGG ATC CAT GCG GCC GGA ATG CGT CGT CCC G-3'; 配列番号2) を使用して、PC

R により、*BamH I* 部位を、アミノ酸残基 330 に相当するヌクレオチド位置

(直後に EcR DNA結合ドメインが続く)の EcR の cDNA 配列に導入した。得られた短縮された EcR コード配列 (EcR³³⁰⁻⁸⁷⁸) をプラスミド pKS+ (Stratagene) にサブクローニングした。

GAL 4 のサブクローンは、前記したように、GAL 4 から Cla I 部位の DNA 配列をコードするアミノ末端を pSK+ (Stratagene) にサブクローニングすることにより、DNA 結合ドメインのコード配列 (アミノ酸 1-147) を含むプラスミド pMA210 から得た (Goff et al., Genes and Development 5:298, 1991)。このプラスミドは pSKGAL2 と呼び、Cla I および Kpn I で切断し、下記の二本鎖オリゴヌクレオチドを挿入した:



得られたプラスミドを pSKGAL2.3 と呼ぶ。完全に融合した 35S/GAL4-EcR³³⁰⁻⁸⁷⁸ は、pSK+ 中の GAL 4 の DNA 結合ドメインおよび pKS+ 中の EcR³³⁰⁻⁸⁷⁸ にフランキングなポリリンカーの BamH I 部位を用いて作製した。これらのコード配列を、フランキング EcoR I 制限部位を用いることにより、単子葉植物発現ベクター pMF6 (実施例 1 に記載) にライゲーションした。このレセプター発現カセットを 35S/GAL4-EcR³³⁰⁻⁸⁷⁸ と呼ぶ。

実施例 4: ウルトラスピラクル由来のリガンド結合ドメインおよび VP16 由来のトランス活性化ドメインをもつ、植物発現可能レセプター発現カセットの構築

USP ポリペプチドの N 末端が C 末端のいずれかに融合した VP16 のトランス活性化ドメインと共に USP のリガンド結合ドメインを含む、レセプター発現カセットを構築した。

C 末端に VP16 のトランス活性化ドメインをもつキメラポリペプチドをコードするレセプター発現カセットを構築するために、レセプター USP の cDNA のカルボキシ末端および終止コドン (実施例 2 に記載) を、コード配列の USP ヌクレオチド番号 1471 の Xho I 部位を用いて pKS+ (Stratagene) にサブクローニングすることにより除去した。アミノ酸 1~490 をコードする得られ

た USP サブクローンを、USP サブクローンのフランキング Kpn I 制限部位、

およびVP16のカルボキシ末端80アミノ酸をコードするpSJT1193CRF3のKpnI部位を用いて、VP16のトランス活性化ドメインに融合させた(Triezenberg et al., *Genes and Develop.* 2:718-729(1988))。得られたUSP-VP16融合物を、USP-VP16のコード配列にフランキンガなEcoRIおよびBamHI制限酵素部位を用いてCaMV35S植物発現ベクターpMF7(実施例1に記載)にクローン化した。このレセプター発現カセットを、35S/USP-VP16と呼ぶ。

アミノ末端に融合した転写活性化ドメインをもつUSP誘導体は、最初に、PCR反応で、オリゴヌクレオチドSF42(5'-CGC GGA TCC ATG GAC AAC TGC GAC CAG GAC-3';配列番号5)を用いて、USP開始コドンに隣接したBamHI部位を改変することにより構築した。VP16の終止コドンを削除し、フランキンガBamHI部位をオリゴヌクレオチドSF37(5'-GCG GGA TCC CCC ACC GTA CTC GTC AAT TC-3';配列番号6)を用いて導入し、開始コドンのすぐ上流に植物共通配列をもつ開始コドン並びにBamHI部位を、PCR反応で、プライマーとしてオリゴヌクレオチドSA115(5'-GTC GAG CTC TCG GAT CCT AAA ACA ATG GCC CCC CCG ACC GAT GTC-3';配列番号7)を用いてアミノ末端に導入した。得られたVP16活性化ドメインおよびUSPコード配列(アミノ酸1~507をコードしている)を、フレーム中で、隣接したBamHI部位に加え、VP16-USPコード配列を、5'BamHIおよび3'EcoRI部位において、CaMV35S植物発現ベクターpMF7に挿入した。このレセプター発現カセットは35S/VP16-USPと呼ぶ。

実施例5: Ecr由来DNA結合ドメインおよびリガンド結合ドメイン、並びにメイズのC1調節遺伝子由来トランス活性化ドメインをもつ、レセプター発現カセットの構築

Ecr²²⁷⁻⁸²⁵-C1融合物は、PCR反応に使用したオリゴヌクレオチドSF

30(5'-CGC-GGA-TCC-ATG-GGT-CGC-GAT-GA

T-CTC-TCG-CCT-TC-3' ; 配列番号8) をもつEcR DNA結合ドメインの直前の開始コドン(全長のEcRコード配列に配置することにより作製した。メイヅC1タンパク質の転写活性化ドメイン(アミノ酸219-273)のコード配列(Goff et al., Genes and Develop. 5:298-309(1991))を、フレーム中で、EcRのアミノ酸51~825のコード配列(EcR KpnI制限酵素部位)に融合した。C1トランス活性化ドメインを、VPGPPSRSRVSI SLHA(配列番号9)をコードするポリリンカーを用いてEcRに連結させた。35S/EcR²²⁷⁻⁸²⁵-C1植物発現ベクター融合物は、コード配列を有するBamHIフラグメントをpMF7ベクターに挿入することにより構築した。このレセプター発現カセットを35S/EcR²²⁷⁻⁸²⁵-C1と呼ぶ。

実施例6: GAL4由来DNA結合ドメイン、EcR由来リガンド結合ドメイン、およびメイヅのC1調節遺伝子由来トランス活性化ドメインをもつ、レセプター発現カセットの構築

GAL4-EcR³³⁰⁻⁸²⁵-C1融合物は、実施例3に記載のGAL4-EcR³³⁰⁻⁸⁷⁸構築物、および実施例5のEcR²²⁷⁻⁸²⁵-C1構築物を用いて構築した。EcRコード領域(アミノ酸456が開始点)を、AatII部位で交換した。このレセプター発現カセットを35S/GAL4-EcR³³⁰⁻⁸²⁵-C1と呼ぶ。

実施例7: GAL4 DNA結合ドメインに対する応答エレメントをもつホタル・ルシフェラーゼをコードする、植物発現可能標的発現カセットの構築

GAL4のDNA結合ドメインに対する反応エレメントを有するホタル・ルシフェラーゼをコードする、植物発現可能標的発現カセットは、下記の方法で構築した。ホタル・ルシフェラーゼの合成を誘導するメイヅ・ブロンズー1(Bz1)コア・プロモーターは、NheIおよびSphI部位を介してBz1レセプター-pBz1LucR98(Roth et al., Plant Cell 3:317, 1991)から取り出し、ルシフェラーゼ遺伝子をもつpUC6S由来プラスミドに配置した。修飾されたBz1コア・プロモーターはヌクレオチド位置-53までのNheI部位(GCTAGC)およびBz1プロモーター配列を含む(Roth et al., Plant Cell 3:317, 1991)。

10個のGAL4結合部位を、EcoRIおよびPstIで消化することによりGAL4調節レポーターpGALLuc2 (Goff et al., Genes and Development 5:298, 1991) から取り、同じ制限酵素部位を用いてpBlue Script (Stratagene) に挿入した。GAL4結合部位の5'末端のHindIII部位を、HindIII/BamHI/HindIIIアダプターを挿入することによりBamHI部位に変化させ、得られたGAL4結合部位を含むBamHIフラグメントを取り出し、ルシフェラーゼを誘導するBz1コア・プロモーターの上流のBglII部位に配置した。この標的発現カセットを(GAL4b.s.)₁₀-BZ1TATA/Lucと呼ぶ。

実施例8：重複配列反応エレメントをもつホタル・ルシフェラーゼをコードする、植物発現可能標的発現カセットの構築

EcREハーフサイトおよびRXR優先ハーフサイトと共に重複配列(DR)反応エレメントを有するホタル・ルシフェラーゼをコードする植物で発現される標的発現カセットは、下記の方法で構築した：実施例7に記載のpUC6S由来プラスミド中、メイズBz1コア・プロモーター・ルシフェラーゼ構築物を開始点として使用した。ハーフサイト間にDR REおよび3塩基対スペーシングを含む二本鎖合成オリゴヌクレオチドを、BamHIおよびBglII粘着末端(SF77: 5'-GAT CCG TAG GGG TCA CGA AGT TCA CTC GCA-3'; 配列番号10)(SF78: 5'-GAT CTG CGA GTG AAC TTC GTG ACC CCT ACG-3'; 配列番号11)を用いて合成し、リン酸化し、アニーリングし、独特なBglII部位に挿入することによりBz1コア・プロモーターの上流にライゲーションさせた。

実施例9：植物細胞の形質転換および化学リガンドの存在下における標的ポリペプチドの発現コントロール

種々のレセプターポリペプチド(本発明のキメラレセプターポリペプチドを含む)による標的ポリペプチド発現のコントロールは、高速マイクロプロジェクトイル・ボンバードメント法を用いて必要な遺伝子構築物で植物細胞を同時に形質転換し、次いで標的ポリペプチドの存在についての生化学的アッセイを行うことにより示することができる。必要な遺伝子構築物は、USPレセプター発現ポリペ

プチドをコードするUSPレセプター発現カセットを含む(図1)。所望により、USPレセプター発現カセットは、USPとは異なるレセプターポリペプチドをコードする第2のレセプター発現カセットを用いて形質転換し得る(図2および3)。加えて、標的ポリペプチドをコードする標的発現カセットもまた必要である。

発現カセットは、同時に、マイクロプロジェクトイルへのDN S沈殿および圧縮ヘリウムにより引き起こされる高速ボンバードメント法という標準的技術を用いた高速マイクロプロジェクトイル・ボンバードメント法を用いて、液体N6増地に培養したメイズ懸濁細胞(Chu et al. *Scientia Sinica* XVIII: 659-668, 1975)に移した(PDS-1000/He, BioRad, Hercules, CA)。形質転換細胞を、N6増地中、約48時間、適当な化学リガンドの存在下、液体懸濁液中でインキュベートした。インキュベート後、形質転換細胞を採取し、次いで、0℃でホモジナイズした。抽出物の残骸を4℃で5分間10,000gで遠心することにより除去した。

標的ポリペプチド発現を、標的発現カセットによりコードされている生成物の存在について抽出物をアッセイすることにより検知した。化学リガンドの存在下でレセプターポリペプチドによる発現の制御を試験する場合、一般的に標的ポリペプチドに使用されるコード配列はホタル・ルシフェラーゼである。ホタル・ルシフェラーゼの活性は、Analytical Luminescence Model 2001 Luminometerを用いて、基質としてATPを用いたルシフェリンのルシフェラーゼ触媒リン酸化(Promega Luciferase Kit、製造番号E1500)により産生された化学発光を定量することにより測定する。

実施例10: レセプターポリペプチドGAL4-EcR³³⁰⁻⁸²⁵-C1およびUSP-VP16は植物細胞の標的ポリペプチドの発現を活性化し、この活性化は幼若ホルモンアゴニストにより阻害される

実施例9の形質転換法を用いて、レセプター発現カセット35S/GAL4-EcR³³⁰⁻⁸²⁵-C1(実施例6)、レセプター発現カセット35S/USP-VP16(実施例4)および標的発現カセット(GAL4b.s.)₁₀-Bz1TATA/Lu

c (実施例 7) をメイズ細胞に同時形質転換した。形質転換細胞を、約 48 時間、化学リガンドとして $10 \mu\text{M}$ フェノキシカルブ (Fenoxycarb) またはメトプレン (Methoprene) の存在下でインキュベートした。実施例 9 に記載のようにルシフェラーゼアッセイを行った。結果を表 1 に示す。

表 1

レセプター	化学リガンド	ルシフェラーゼ活性 (光単位)
実験 # 1		
なし	なし	2,503
35S/GAL4-EcR ³³⁰⁻⁸²⁵ -C1+35S/USP-VP16	なし	277,862
35S/GAL4-EcR ³³⁰⁻⁸²⁵ -C1+35S/USP-VP16	フェノキシカルブ	77,418
35S/GAL4-EcR ³³⁰⁻⁸²⁵ -C1+35S/USP-VP16	メトプレン	14,786
実験 # 2		
なし	なし	1,302
35S/GAL4-EcR ³³⁰⁻⁸²⁵ -C1+35S/USP-VP16	なし	178,092
35S/GAL4-EcR ³³⁰⁻⁸²⁵ -C1+35S/USP-VP16	メトプレン	5,730

上記の結果より、GAL4 反応エレメントを含む標的発現カセットの 5' 調整領域は、植物細胞において、レセプターポリペプチド GAL4-EcR-C1 および USP-VP16 により活性化することができ、この活性化は幼若ホルモンアゴニストの存在下で逆転することが示されている。標的ポリペプチド・ルシフェラーゼの発現レベルは、幼若ホルモンアゴニストの存在下では、その非存在下に比較して 3.5 ~ 3.1 倍低かった。

実施例 11: レセプターポリペプチド GAL4-EcR³³⁰⁻⁸²⁵-C1 および USP-VP16 は植物細胞の標的ポリペプチドの発現を活性化し、この活性化は幼若ホルモンアゴニストにより阻害される

実施例 9 の形質転換法を用いて、レセプター発現カセット 35S/GAL4-

EcR³³⁰⁻⁸²⁵-C1 (実施例 6)、レセプター発現カセット 35S/USP-V

P16（実施例4）および標的発現カセット(GAL4b.s.)₁₀-BZ1TATA/Luc（実施例7）をメイズ細胞に同時形質転換した。形質転換細胞を、約48時間、化学リガンドとして、10 μ Mフェノキシカルブまたはメトブレンと共におよびそれ無しで、10 μ Mテブフェノジドの存在下、インキュベートした。実施例9に記載のようにルシフェラーゼ・アッセイを行った。結果を表2に示す。

表2

レセプター	化学リガンド	ルシフェラーゼ活性 (光単位)
なし	なし	1,302
35S/GAL4-EcR ³³⁰⁻⁸²⁵ -C1+35S/USP-VP16	なし	178,092
35S/GAL4-EcR ³³⁰⁻⁸²⁵ -C1+35S/USP-VP16	テブフェノジド	908,912
35S/GAL4-EcR ³³⁰⁻⁸²⁵ -C1+35S/USP-VP16	テブフェノジド+ メトブレン	159,873

上記の結果より、GAL4応答因子を含む標的発現カセットの5'調整領域は、植物細胞において、化学リガンドのテブフェノジドに応答してレセプターポリペプチドGAL4-EcR-C1およびUSP-VP16により活性化することができ、この活性化は幼若ホルモニアゴニストであるメトブレンの存在下で阻害されることが示される。テブフェノジド誘導ルシフェラーゼ遺伝子発現活性化のレベルは単独で使用した場合には約6倍増加し、幼若ホルモニアゴニストであるメトブレンが存在すると完全に阻害された。

実施例12：レセプターポリペプチドVP16-USPは植物細胞の標的ポリペプチドの発現を活性化する

実施例9の形質転換法を用いて、レセプター発現カセット35S/VP16-USP（実施例4）および標的発現カセット(DR3)₃-BZ1TATA/Luc（実施例8）を含むプラスミドをメイズ細胞に同時形質転換した。形質転換細胞を、48時間、化学リガンドとして10 μ Mメトブレンの存在下でインキュベートした。

実施例9に記載のようにルシフェラーゼアッセイを行った。結果を表3に示す。

表3

レセプター	化学リガンド	ルシフェラーゼ活性 (光単位)
なし	なし	5,690
35S/VP16-USP	なし	29,967
35S/VP16-USP	メトブレン	485,458

上記の結果により、重複配列反応エレメントを含む標的発現カセットの5'調整領域は、植物細胞において、幼若ホルモンアゴニストの存在下、レセプターポリペプチドVP16-USPにより活性化することができることが示される。標的ポリペプチド・ルシフェラーゼの発現レベルは幼若ホルモンアゴニストの非存在下において観察されたものの約16倍であった。

実施例13: EcR、USP、またはRXR誘導体を発現し、レセプター調整レポーターを有する、シロイナズナ属植物を形質転換するためのベクターの構築

アグロバクテリウムT-DNAベクタープラスミドは、前記したプラスミドpGPTV-KanおよびpGPTV-Hyg (Becker et al., Plant Mol. Biol. 20:1195-1197(1992)) から構築した。pGPTV-KanおよびpGPTV-Hygプラスミド両方のSacI/HindIII uidA (GUS) レポーター遺伝子を、pGEM4Z f(+), pSPORT1, pBluescriptKS(+), pIC20H, またはpUC18由来のSacI/HindIIIポリリンカーで置換し、プラスミドpSGCFW、pSGCFX、pSGCFY、pSGCFZ、pSGCGA、pSGCGC、pSGCGD、pSGCGE、pSGCGF、およびpSGCGGをそれぞれ得た。標的発現カセットであるGAL4調整ルシフェラーゼレポーターを、はじめに実施例7に記載の10個のGAL4結合部位およびメイズBronze-1 TATAをもつ328bp KpnI/HindIIIフラグメントを、修飾ルシフェラーゼレポータープラスミドpSPLuc+ (Promega) のKpnI/HindIII部位にサブクローニング

することにより、T-DNAアグロバクテリウムプラスミドとして構築し、プラ

スミド pSGCFO1 を作製した。GAL4 結合部位 Bz1 TATA-ルシフェラーゼレポーターを含む pSGCFO1 由来の 1.991 Kb KpnI/XbaI フラグメントを、pSGCFX1 の 7.194 NdeI/SpeI フラグメントおよび上記の pSGCFZ1 の 4.111 NdeI/KpnI フラグメントへライゲーションすることにより、T-DNA ベクターにサブクローニングした。得られたプラスミドは pSGCGL1 と呼び、トランスジェニック植物においてカナマイシンに耐性を付与する nos プロモーターにより誘導される NPTII 選択マーカー、および GAL4 調整ルシフェラーゼレポーターを有する。10 個の GAL4 結合部位をもつ GAL4 調整 GUS レポーター、35S TATA 領域および GUS コード領域を同様な方法で構築し、pAT86 と呼ぶ。実施例 8 に記載したものと類似の、3 コピーの DE RE、Bz1 TATA、ルシフェラーゼコード領域、および nos ターミネーターをもつ重複配列 (DR) 反応エレメントレポーターを、pSGCGL1 に記載したのと類似の方法で構築し、pSGCHU1 と呼ぶ。実施例 3~6 に上記のレセプター発現カセットを使用して、CaMV 35S プロモーターおよび nos ポリアデニル化シグナルを有する類似アグロバクテリウム T-DNA 構築物を構築した。一重または二重レセプター構築物を、適当な発現カセットを GAL4-ルシフェラーゼレポーター pSGCGL1 にサブクローニングすることにより作製した。

実施例 14: VP16-USP を発現し、DR-ルシフェラーゼレポーターを有するトランスジェニックシロイナズナ属の作製

シロイナズナ (コロンビア) を、CaMV 35S プロモーターおよび DR-ルシフェラーゼレポーター (実施例 13 に上記) をもつアグロバクテリウムベクターを用いて、下記の真空一浸潤法で形質転換した。エレクトロコンピテント GV3101 アグロバクテリウム細胞は、0.5~0.7 単位の OD₆₀₀ で 24~30 時間、通気して、28℃で、2×YT 培地中で GV3101 アグロバクテリウムをインキュベートすることにより調製した。細胞を 10~30 分間氷上で冷却し、4℃で 5,000 RPM で 5 分間遠心した。上清を廃棄し、細胞ペレットを 1 容

量の氷冷10%グリセロール中に再び懸濁した。細胞を再度4℃で5,000 RPMで5分間遠心した。上清を廃棄し、細胞ペレットを0.05容量の氷冷10%グリセロール中に再び懸濁した。細胞を再び4℃で5,000 RPMで5分間遠心した。上清を廃棄し、細胞ペレットを0.02容量の氷冷10%グリセロールに再び懸濁した。細胞を再び4℃で5,000 RPMで5分間遠心した。上清を廃棄し、細胞ペレットを0.02容量の氷冷10%グリセロール中に再び懸濁した。細胞を再度4℃で5,000 RPMで5分間遠心した。上清を廃棄し、細胞ペレットを0.01容量の氷冷10%グリセロールに再度懸濁した。細胞を1.5 mlのマイクロヒュージチューブに200 mlずつに分け、液体N₂で急速冷凍し、-80℃で貯蔵した。エレクトロコンピtent細胞を使用し、その後-80℃で貯蔵した。冷凍エレクトロコンピtent細胞を氷上で解凍し、40 mlを冷凍前の1.5 mlマイクロヒュージチューブに移した。適当なアグロバクテリウムプラスミドDNA (2~10 ng) 1 mlを解凍した細胞に加え、氷上で混合した。細胞/プラスミド混合物を冷凍前の0.2 cmBio-Radエレクトロポレーションキューベットに移し、2.0キロボルト、600オーム、25 μ ファラドで、一律6秒でエレクトロポレーションを行った。2×YT培地1 mlをエレクトロポレーションキューベットに加え、細胞/プラスミド溶液をピペットチップで混合し、内容物を新しい1.5 mlマイクロヒュージチューブに移した。次いで、細胞を200 RPMで攪拌機で37℃で1時間インキュベートした。細胞を、エッペンドルフ適用スピード遠心機で6の設定で2分間遠心し沈降させ、上清をデカントし、細胞ペレットを残りの液体に再び懸濁した。再懸濁した細胞を適当な抗生物質と共にLB培地プレートに撒いた。プレートを2~3日間28~30℃でインキュベートした。LB培養物50 mlを、100 μ g/mlリファンピシンおよび25 μ g/mlゲンタマイシンおよび100 μ g/mlカナマイシンと共に250 mlフラスコ中、単一の形質転換コロニーを用いて接種した。培養物を250 RPM、28℃で24~36時間インキュベートし、培養物10 mlを用いて2 lフラスコ中の500 ml LB+抗生物質に接種した。この培養物を250 RPMで攪拌しながら、28℃で一晩インキュベートした。プラスミドDNAをこのアグロバクテリウム培養物から単離し、

制限解析により確認した。

シロイナズナ属植物を、16時間明るく、8時間暗く、20℃であるように設定したフィトロン中の3インチ平方のプラスチック鉢でメッシュで覆った土壤で4~5週間育成させた。花芽分裂組織が約2インチの高さになるまで植物を成長させた。形質転換すべきシロイナズナ属植物の花芽分裂組織を、アグロバクテリウムにさらす2日前に取り除いた。アグロバクテリウム培養物を5000RPMで5分間遠心し、得られたペレットを500ml浸潤培地(4.3g MS塩/l、5%スクロース、0.01mg/mlベンジルアミノプリン、100ml/ISilwet L77、pH 5.8)に再び懸濁した。シロイナズナ属植物を水に浸し、土壤を飽和する。細菌細胞懸濁液500mlを滅菌真空デシケーターの底に移し、鉢植えのシロイナズナ属植物をアグロバクテリウム溶液に逆にしておく。5分間デシケーターを真空にし、次いでゆっくりと解除する。この真空処理を3回繰り返し、植物を過剰のアグロバクテリウムで洗浄し、育成チャンバーに戻す。真空-浸潤植物を成熟させ、花を咲かせ、種を付けさせた。得られた種をさらに約5~10日間、95℃、低湿度の乾燥室で乾燥させた。種を乾燥した花から破砕して取り、次いで425ミクロンのメッシュのふるいを通して濾過した。真空浸潤後、種を得るのに約5週間かかる。完全に乾燥したら、約240mgの種を70% EtOH 1mlを加えて滅菌し、しっかりとボルテックスをかけ、室温で2分間インキュベートした。種をエッペンドルフマイクロヒュージ中で短く高速遠心し、上清を廃棄した。ペレット状の種を滅菌緩衝液1ml(1部の10% Triton X-100、10部の漂白剤、20部のdd H₂O)中に再度懸濁し、ボルテックスをかけ、室温で30分間インキュベートした。種をエッペンドルフマイクロヒュージ中で短く高速遠心し、上清を除去した。種を滅菌dd H₂O 1mlに懸濁し、ボルテックスをかけ、マイクロヒュージで高速遠心し、上清を除去した。この洗浄工程を3回繰り返し、次いで、種をdd H₂O 5ml中で最終洗浄として50mlの遠心チューブに移した。種をBeckman卓上型遠心機で最高速度で短く遠心した。上清をデカントし、種を50℃で滅菌0.8w/v低沸点アガロース24ml中に再び懸濁し、混合し、8mlを、選択用の抗生物質(カナマイシン50 µg/mlまたはヒグロマイシン50 µg/ml)のい

か) およびカルベニシリン500 $\mu\text{g/ml}$ を含有する、各3つの150mm発芽培地(GM)プレート(Murashige and Skoog, *Physiol Plant* 15:473-497, 1962)に等分した。撒いた種を4℃で暗所で24時間インキュベートし、次いで、1日当たり20℃で16時間明るく、8時間暗くなるように設定した育成チャンパーに移した。発芽した実生を5~10日間プレート上で選択し、小さい植物を新しい選択プレートに移植し、5~10日間さらに選別した後、土壌に移植した。新しく移植した小さい植物を2~3日間プラスチックの覆いで覆い、次いで花芽分裂組織の開始まで育成させた。

実施例15: 単離トランスジェニック植物組織の化学誘導

トランスジェニック植物を下記の技術により誘導性遺伝子発現について試験した。およそ同じサイズの2枚の葉をトランスジェニック植物から取り、0.1%エタノールまたは0.1%エタノールおよび10 μM メトプレンはフェノキシカルブと共に、カナマイシン50 $\mu\text{g/ml}$ (または導入遺伝子がこのマーカーを保持すればヒグロマイシン25 $\mu\text{g/ml}$)を含有する水中でインキュベートした。葉を実施例14に記載した標準的な育成条件下で約24時間インキュベートした。誘導化合物でインキュベートした後、葉抽出物を500 μl の100mM KPO4 1mM DTT、pH 7.8緩衝液中で0℃で葉をホモジナイズすることにより調製した。抽出物をエッペンドルフマイクロヒュージ中、4℃で5分間遠心し、アッセイまで0℃で貯蔵した。各抽出物のルシフェラーゼ活性を、製薬業者の指示に従って、Analytical Luminescence Model 2010 LuminometerおよびPromega Luciferase Assay Systemを用いて測定した。抽出タンパク質濃度はPierce BC A Protein Assayを用いて測定した(Smith et al., *Anal. Biochem.* 150:76-85)。ルシフェラーゼ値は、室温における抽出タンパク質100 μg 当たりの10秒当たりの光単位として示す。下の表4に示すように、フェノキシカルブ処理により、ルシフェラーゼ活性が6.2倍増加し、メトプレンはルシフェラーゼ活性が25倍増加した。

表 4

レセプター	化学リガンド	ルシフェラーゼ活性 (光単位)
なし	なし	638
35S/VP16-USP	フェノキシカルブ	3,991
35S/VP16-USP	メトブレン	15,790

実施例16: USPまたはRXR誘導体を発現し、レセプター調整レポーターを有する、トランスジェニック植物または植物細胞を用いた、USPに結合する新リガンドのスクリーニング

植物細胞環境において有効なUSPまたはRXRの新リガンドは、適当なレセプターポリペプチドも発現するトランスジェニック植物または植物細胞において標的発現カセットであるレセプター調整レポーターの発現に基づくスクリーニング法を用いて検知することが可能である。このように、標的ポリペプチド発現のUSPまたはRXR活性化を仲介する能力について試験すべき化学物質を、種々の濃度でトランスジェニック植物または植物細胞と接触させ、その後、レポーター遺伝子発現のアッセイを行う。例えば、1) 標的発現カセットとして、GAL4-EcRおよびUSP-VP16およびレセプター発現カセットとしてGAL4調整ルシフェラーゼレポーターを有するトランスジェニック植物または植物細胞を、試験すべき物質にさらし、Hamamatsu Light Detection Deviceなどの光増幅装置を用いてさらされていない植物と比較することができ、2) 標的発現カセットとしてGAL4調整GUSレセプターおよびGAL4-EcR-C1およびVP16-RXRのレセプター発現カセット有するトランスジェニック植物または植物細胞を、試験すべき物質にさらし、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル β -D-グルクロニドまたはo-ニトロフェニル β -D-グルクロニドなどの色素生産性物質の除去を触媒する能力についてさらされていない植物と比較することができ、3) DRRE調整ルシフェラーゼレポーターおよびVP16-USPの発現カセットを有するトランスジェニック植物または植物細胞を試験すべき物質にさらし、Hamamatsu Light Detection Deviceなどの光増幅装置を

用

いて、さらされていない植物と比較することができる。上記のスクリーニング法で利用できないことが分かった陽性対照は、テブフェノシドおよびメトブレンを含むがそれに限定されない。上記の各場合において、試験物質の非存在下における発現レベルと比較して試験物質の存在下における標的ポリペプチド発現検知レベルが高かったことは、この方法で使用したレセプター発現カセットに依存して、試験物質はU S PまたはR X Rのいずれかのリガンドであることを示している。このように、植物細胞環境においてU S Pのリガンドであると以前は知られていなかった試験物質がそうであると同定され得、または、植物細胞環境においてU S Pのリガンドであることが疑わしい試験物質がそうでないと確認することができる。

実施例17：低い基礎活性をもつレセプターポリペプチド変異体の単離

Ultraspiracleレセプター (U S P) のリガンド結合ドメインにおける変異は、Leung et al., Technique 1:11-15 (1989) が記載したPCR変異生成を用いてインビトロでおこした。変異U S Pリガンド結合ドメインのPCRフラグメントを、V P 1 6の転写活性化ドメインに作業可能に結合させた酵母発現ベクターにクローン化した。変異構築物を、酵母G A L 4レポーター株G G Y::1 7 1に形質転換した。酵母形質転換体をインディケーターX-Galを含む培地に撒いた。ヘテロダイマーに対するU S Pレセプターポリペプチド活性の基礎レベルが低い突然変異体は、X-Galインディケータープレート上に白色から明青色のコロニーを産生し、一方、非突然変異U S Pレセプターポリペプチドを発現する形質転換体は暗青色のコロニーを産生した。白色から明青色のコロニーを、レセプターポリペプチド活性の基礎および化学リガンド誘導レベルについて、グリセロール、エタノールおよびガラクトースを炭素源として含むS培地にそれらの選択したコロニーを示す酵母細胞を成長させることにより試験した。得られた培養物を2部に分け、1つは幼若ホルモンまたはそのアゴニストの1つで処理し、他方は化学リガンドの非存在下における対照として使用した。幼若ホルモンまたはそのアゴニストにさらした後、培養物の処理および対照部分を、Millerの実験方法 (

Experiments in Molecular Genetics, p.352-355, J.H.Miller編, Cold Spring Harb

or Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1972) にしたがって β -ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした。この技術で単離され同定された変異レセプターポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、さらに続く試験の候補である。なぜなら、コードするレセプターポリペプチドは、植物細胞において、低い基礎活性、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの1つの存在下における標的遺伝子発現の誘導の大きな増加、または異なる幼若ホルモンのアゴニストに異なる応答を示し得るからである。

実施例18：植物細胞の改善された機能をもつ変異ポリペプチドの同定

実施例15の変異USPレセプターポリペプチドをコードするレセプター発現カセットを、上記の実施例2および4に従って調製した。実施例8の標的発現カセットと組み合わせた、これらのレセプター発現カセットを、実施例9の方法に従って植物細胞に形質転換した。形質転換した植物細胞を、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの1つの存在下、変異レセプターポリペプチドによる標的発現カセットの5'調整領域の活性化について試験した。変異USPレセプターポリペプチド（これは、植物細胞において、幼若ホルモンまたはそのアゴニストの1つの存在下で化学リガンドの非存在下で標的ポリペプチドの基礎発現が低く、標的ポリペプチドの発現が高い）は、植物における遺伝子発現をコントロールするのに有益である。

実施例19：トランスジェニック植物の子孫栽培

実施例14で調製したシロイナズナ（コロンビア）の形質転換植物を、16時間明るく、8時間暗い20℃に設定したフィトロン装置中の3インチ平方のプラスチック鉢でメッシュで覆った土壌で4～5週間育成させる。植物は、外来DNAを本発明に記載のレセプターおよび標的発現カセットの形でゲノムに組み込んで含む。この組み込まれたDNAは、形質転換植物の生活環により、繁殖の過程を通してある植物世代から次の世代へと移行する。繁殖は、雄性配偶体および胞子体または配偶体雌性組織が相互作用して良好な接合体を産生する過程である。

。成熟した花粉粒は花の葯で産生され、柱頭の表面に付き（授粉）、水和し発芽して花粉管へと成育する。花粉管の精子細胞は子房（雌雄異株）に存在する胚嚢に

運ばれ、受精が起こり（配偶子融合）接合体ができる。種の形の接合体は、次世代の植物系統の実現である。この次世代を、形質転換植物の「子孫」と呼ぶ。子孫は自家受精により形成され得、雄性配偶体および雌性配偶体組織は同じ個体の植物から生じる。これは、単一の植物が次世代のゲノムDNAの源であることを意味する。別に、次世代の植物を産生するために、ある植物由来の雄性配偶体を別の植物の雌性胞子体組織と接触させることによる、2つの別々の植物の他家受精により、子孫を産生し得る。この場合、子孫のゲノムDNAは2つの別々の植物由来である。さらに、形質転換植物を非形質転換植物と他家受精すると、子孫のゲノムDNAはある植物由来のトランスジェニックDNAおよび別の植物由来の非トランスジェニックゲノムDNAからなる。形質転換植物の子孫が、自家受精または他家受精により産生されたかにかかわらず、ゲノムに取り込まれた外来DNAの存在のために、いくつかの子孫においては、遺伝的寄与は等価ではない。この等価でない遺伝的寄与は、古典的な遺伝学および分子生物学の技術を用いて確認することができる。

本発明に記載のレセプターおよび標的発現カセットを含む次世代の植物を産生するために、元の形質転換植物を、コントロールされた環境条件下、成熟させ、花を付け、種を付けさせる。得られた種は、さらに、低温度で95°Fで約5〜10日間乾燥室で乾燥させる。種を長角果を破砕して乾燥させた花から取り除き、次いで、425 μmのメッシュのふるいを通して濾過し、種を他の植物物質から分離する。次いで、種を使用して植物のさらに次の世代を育てる。

形質転換植物の次世代を産生する方法は、シロイナズナ属について記載したが、一般的に、ゲノムに、本発明に記載のレセプターおよび標的発現カセットを取り込んだ、全ての被子植物に適用可能である。

本明細書に記載の全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する当業者の技術レベルを示すものである。全ての刊行物および特許出願は、各々の個々の刊行

物または特許出願が個々に引用して取り込むと特別に個々に示したと同じように、本明細書において引用して取り込む。

前記の発明は、理解し易くするために説明を加え詳細に記載したが、変化およ

び修飾を、添付の請求の範囲内においてなし得ることは明らかである。

配列表

(1) 一般情報:

(i) 出願人:

- (A) 名称: チバーガイギー・アクチエンゲゼルシャフト
- (B) 通り: クライベックシュトラッセ141番
- (C) 市: バーゼル
- (D) 国: スイス
- (F) 郵便番号 (ZIP): 4002
- (G) 電話: +41 61 69 11 11
- (H) Fax: +41 61 696 79 76
- (I) Telex: 962 991

- (ii) 発明の名称: 受容体媒介トランス活性化による植物内のコントロール
遺伝子発現のための化学リガンドとしての幼若ホルモン
またはそのアゴニストの一つ

(iii) 配列の数: 11

(iv) コンピューター解読書式:

- (A) 媒介型: フロッピー・ディスク
- (B) コンピューター: IBM PCコンパティブル
- (C) オペレーティング・システム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B

(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列の特徴

- (A) 配列の長さ: 42塩基対
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 記載: /desc=「オリゴヌクレオチド SF43」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号1:

CGCGGATCTT AAACAATGAA GCGGCGCTGG TCGACAAAG GC

42

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 34塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「オリゴヌクレオチド SF23」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号2:

CGCGGATCTT ATGCGCGCGG AATGCGTCTG CCGG

34

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 26塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「pSKGAL2.3を作製するために
使用した正鎖オリゴヌクレオチド」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号3:

CGCGGATCTT TAAGTAAGTAA AGGTAC

26

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 20塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「pSKGAL2.3を作製するために
使用した相補鎖オリゴヌクレオチド」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号4:

CTTACTTACT TAGGATCCCC

20

(2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 30塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「オリゴヌクレオチド SF42」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号5:

CCCGGATCCA TGGCAACTG CGACGAGAC

30

(2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 29塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「オリゴヌクレオチド SF37」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号6:

GCGGGATCCC CCRCCGTACT CGTCAATTC

29

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 45塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「オリゴヌクレオチド SA115」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号7:

GTGAGACTCT CGGATCTAA AACATGGCC CCCCCGACG ATGTC

45

(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 35塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「オリゴヌクレオチド SF30」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号8:

CCCGATCCA TGGGTGCGA TGAATCTGCG CCTTC

35

(2) 配列番号9の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 16 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイボセティカル: NO

(v) フラグメントの型: 中間部フラグメント

(xi) 配列: 配列番号9:

Val	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Arg	Ser	Arg	Val	Ser	Ile	Ser	Leu	His	Ala
1				5					10					15	

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 30 塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「プライマー SF77」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号10:

GATCGGTAGG GGTCAAGAG TTCCTGCA

30

(2) 配列番号11の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 30 塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 記載: /desc=「プライマー SF78」

(iii) ハイボセティカル: NO

(xi) 配列: 配列番号11:

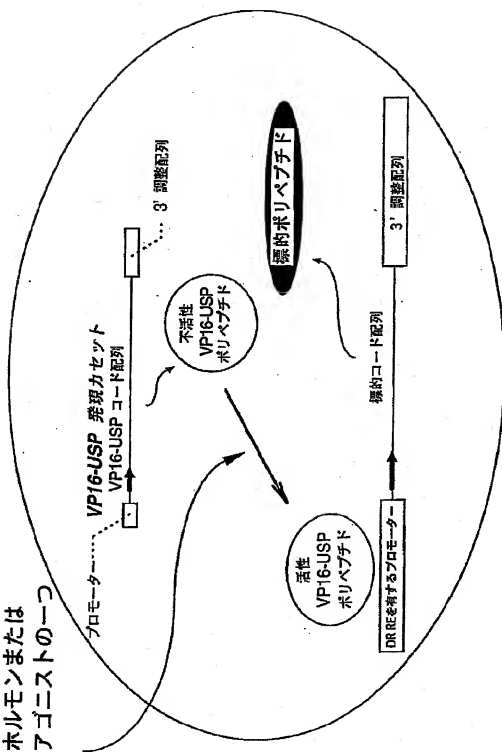
GATCTGGGAG TGAAGTTCGT GACCCCTAAG

30

【図1】

図1:

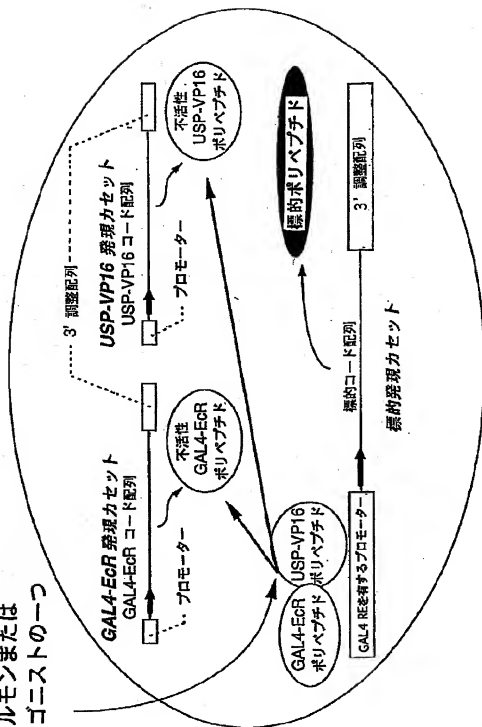
幼若ホルモンまたは
そのアゴニストの一つ



【図2】

図2:

幼若ホルモンまたは
そのアゴニストの一つ



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No.
IPC 6: C12N15/82 C12N5/10 A01H5/09 C12Q1/68 G01N33/53		PCT/EP 95/84224
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C12N A01H C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
X	WO 94 01558 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 20 January 1994	29
A	---	1-28, 30, 31
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, June 1995, WASHINGTON US, pages 6157-6160, XP002024676 HARMON, M.A., ET AL.: "Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene" see the whole document	29
A	---	24, 28
P, X	WO 96 27673 A (CIBA GEIGY AG) 12 September 1996 see the whole document	1-6, 30

	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which in itself or in combination with the prior art of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report
6 February 1997		05.03.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2911 Patentstra 2 NL-2200 AD Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Maddox, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 96/04224

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 14695 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 3 October 1991 see claim 13 ---	24,28
A	WO 93 09237 A (SANDOZ AG ; SANDOZ AG (DE); SANDOZ LTD (CH)) 13 May 1993 see page 13 - page 15; example 9 ---	1-31
A	SCIENCE, vol. 266, 21 October 1994, pages 436-439, XP082003449 LLOYD A M ET AL: "EPIDERMAL CELL FATE DETERMINATION IN ARABIDOPSIS: PATTERNS DEFINED BY A STEROID-INDUCIBLE REGULATOR" see the whole document ---	1-31
A	WO 93 23431 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 25 November 1993 see page 49 - page 52 ---	1-31
A	WO 93 21334 A (ZENECA LTD ; CADDICK MARK XAVIER (GB); GREENLAND ANDREW JAMES (GB);) 28 October 1993 see the whole document ---	1-31
A	EP 0 465 024 A (PIONEER HI BRED INT) 8 January 1992 see the whole document ---	15
A	WO 90 08830 A (ICI PLC) 9 August 1990 see the whole document ---	15
A	EP 0 589 841 A (CIBA GEIGY AG) 30 March 1994 see the whole document ---	15
A	WO 94 21804 A (PIONEER HI BRED INT; NEILL JOHN D (US); PIERCE DOROTHY A (US); CIG) 29 September 1994 see page 25, line 30 - page 26 ---	15
A	WO 95 29668 A (NICKERSON BIOCEM LTD ; GENE SHEARS PTY LTD (AU); PAUL WYATT (GB); S) 3 August 1995 see the whole document -----	15

Form PCT/ISA/210 (continuation of formal sheet) (July 1995)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...information on patent family members

Inter national Application No

PCT/EP 96/04224

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9401558	20-01-94	AU-A- 4769793 CA-A- 2137462 JP-T- 8501211	31-01-94 20-01-94 13-02-96
WO-A-9627673	12-09-96	AU-A- 4878296	23-09-96
WO-A-9114695	03-10-91	AU-B- 655417 AU-A- 7668391 CA-A- 2075192 EP-A- 0522054	22-12-94 21-10-91 23-09-91 13-01-93
WO-A-9309237	13-05-93	AU-B- 670417 AU-A- 2920392 EP-A- 0611395 HU-A- 66207 JP-T- 7500965 ZA-A- 9208538	18-07-96 07-06-93 24-08-94 28-10-94 02-02-95 05-05-94
WO-A-9323431	25-11-93	US-A- 5364791 AU-A- 4241793 CA-A- 2135644 EP-A- 0745121 JP-T- 7500964	15-11-94 13-12-93 25-11-93 04-12-96 26-10-95
WO-A-9321334	28-10-93	AU-A- 3961993 EP-A- 0637339	18-11-93 08-02-95
EP-A-0465024	00-01-92	AU-B- 643791 AU-A- 7735891 CA-A- 2042447 JP-A- 6046697 US-A- 5478369 US-A- 5432068	25-11-93 19-12-91 13-12-91 22-02-94 26-12-95 11-07-95
WO-A-9008830	09-08-90	AU-B- 621195 AU-A- 4945690 CA-A- 2008700 EP-A- 0455665 JP-T- 4504500	05-03-92 24-08-90 26-07-90 13-11-91 13-08-92

Form PCT/ISA/210 (gross); Revised annex (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 96/04224

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0589841	30-03-94	US-A- 5409823	25-04-95
		BR-A- 9383877	29-03-94
		CA-A- 2186718	25-03-94
		HU-A- 69965	28-09-95
WO-A-9421804	29-09-94	US-A- 5583210	18-12-96
		AU-A- 6355194	11-10-94
		BR-A- 9405950	19-12-95
		CA-A- 2158584	29-09-94
		DE-T- 4491714	27-06-96
		HU-A- 73336	29-07-96
		JP-T- 8507691	28-08-96
		NL-T- 9420020	01-05-96
		PL-A- 310702	27-12-95
WO-A-9520668	03-08-95	AU-A- 1540995	15-08-95
		CA-A- 2182278	03-08-95
		EP-A- 0741790	13-11-96

Form: PCT/ISA/210 (patent family member) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

サーチコード(参考)

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 5/00

C

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN